Analyse der T-Zell Immunantwort bei der persistenten Infektion der Maus mit dem murinen Zytomegalovirus

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MATTHIAS JOHANNES REDDEHASE
aus Mittenwald

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Analyse der T-Zell Immunantwort bei der persistenten Infektion der Maus mit dem murinen Zytomegalovirus

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MATTHIAS JOHANNES REDDEHASE
aus Mittenwald

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	9. Februar 1984
Dekan:	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. U.H.Koszinowski
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Bessler

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, unter Anleitung von Priv.Doz.Dr.U.H.Koszinowski durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Reddehase,M.J., G.M.Keil und U.H.Koszinowski. 1984.
The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. I. Distinct maturation stages of cytolytic T lymphocytes constitute the cellular immune response during acute infection of mice with the murine cytomegalovirus. J.Immunol. 132:482-489.

Reddehase, M.J., G.M. Keil und U.H. Koszinowski. 1984.
The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. II. Detection of virus replication stage-specific antigens by separate populations of in vivo active cytolytic T lymphocyte precursors. Eur. J. Immunol. 14:56-61.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.U.H.Koszinowski. Er hat nicht nur die für das Gelingen der Arbeit notwendigen organisatorischen und finanziellen Voraussetzungen geschaffen sondern auch durch Ideen und konstruktive Kritik maßgeblich zu den wissenschaftlichen Inhalten beigetragen.

Frau A.Lüske danke ich für ihren unermüdlichen und selbstlosen Einsatz bei der Durchführung der Experimente, Herrn R.Straub und Herrn P.Schröter für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen sowie Frau M.-L.Donner und Frau C.Dicker für Geduld und Sorgfalt bei der Reinschrift des Manuskripts.

Durch das Erstellen von Computerprogrammen hat sich mein kleiner Bruder M.Reddehase um die Versuchsauswertung verdient gemacht und Herrn Dr.R.J.Lorenz verdanke ich Ratschläge zu Problemen der Statistik. Herr Dr.G.M.Keil hat in unserer Arbeitsgruppe die virologischen Methoden etabliert und damit die Bearbeitung wichtiger Fragen ermöglicht.

Herrn Prof.Dr.W.Bessler danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die klinische Problematik latenter CMV Infektionen	1
1.2	Das murine Modellsystem	3
1.2.1	Parameter des Modellsystems	3
1.2.2	Taxonomie und histologische Diagnose	4
1.2.3	Genomorganisation und Virion-Morphologie	5
1.2.4	Temporales Muster von viraler Transkription und Proteinsynthese in MCMV-infizierten Zellen	6
1.3	Die Definition von Persistenz und Latenz	8
1.4	Hinweise auf eine regulatorische Funktion der zellulären Immunität bei der Etablierung von Latenz	9
1.5	Die Immune Surveillance Theorie der Latenz als Arbeitshypothese	12
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Versuchstiere	14
2.1.1	Mäuse	14
2.1.2	Ratten	14
2.2	Viren	14
2.2.1	Murines Zytomegalovirus	14
2.2.2	Rabiesvirus	15

		Seite
2.3	Kulturmedien und Kulturbedingungen	15
2.3.1	Expansionsmedium IL-MEM-ALPHA	15
2.3.2	Assaymedium RPMI 1640	16
2.3.3	Mitogenmedium ConA-RPMI	16
2.3.4	Fibroblastenwachstumsmedium MEF-MEM	16
2.3.5	Kulturbedingungen	16
2.4	Immunologische Methoden	17
2.4.1	Herstellung von Interleukin	17
2.4.2	Intraplantare Infektion zur Induktion einer zellulären Immunantwort	18
2.4.3	Ansatz von Mikrokulturen	18
2.4.3.1	Herstellung einer Lymphozytensuspension	18
2.4.3.2	Limiting Dilution Assay (Grenzverdünnungs-experiment)	19
2.4.3.3	Behandlung von Lymphozyten mit Mitomycin C zur Herstellung von Stimulatorzellen	20
2.4.4	Physikalische Trennung von Lymphozyten durch Dichtestufengradienten - Zentrifugation nach dem Flotations-Sedimentationsverfahren	20
2.4.5	Charakterisierung von T-Lymphozyten anhand von Oberflächenmarkern	21
2.4.5.1	Monoklonale Antikörper und Complement	21
2.4.5.2	Depletion von Populationen sensibilisierter Lymphozyten vor in vitro Expansion	21
2.4.5.3	Bestimmung des Phänotyps der Effektor-CTL	22
2.4.6	Nachweis zytolytischer Effektorzellen	22
2.4.6.1	Radioaktive Markierung von Zielzellen und Test der zellvermittelten Lyse (CML-Assay)	22
2.4.6.2	CML-Assay in Gegenwart von Concanavalin A	23
2.5	Virologische und immunchemische Methoden	24
2.5.1	Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten	24
2.5.2	Anzucht und partielle Reinigung von MCMV	24
2.5.3	Virusnachweis und Titerbestimmung durch Plaque-Tests	25

		Seite
2.5.3.1	Konventionelle Bestimmung des Virustiters	25
2.5.3.2	Nachweis produktiv infizierter Zellen durch Kokultivation mit MEF Indikatorzellen (Infectious Center Test)	25
2.5.3.3	Technik der zentrifugalen Infektion	25
2.5.3.4	Virusnachweis und zentrifugale Titerbestimmung in Organen akut, persistent oder rekurrent infizierter Mäuse	26
2.5.4	Virusinfektion von MEF zur Herstellung von Stimulatorzellen und Zielzellen	27
2.5.4.1	Infektion von MEF mit Rabiesvirus	27
2.5.4.2	Infektion von MEF mit MCMV zur Herstellung der Zielzellen Late-MEF und Early-MEF	27
2.5.4.3	Infektion von MEF mit MCMV und Behandlung mit den metabolischen Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D zur Herstellung der Zielzelle Immediate Early-MEF	27
2.5.4.4	UV-Bestrahlung von MCMV zur Herstellung scheininfizierter MEF	28
2.5.5	Analyse der Proteinsynthese in MCMV-infizierten MEF	28
2.5.5.1	Gewinnung von MCMV-spezifischem Antiserum	28
2.5.5.2	Immunpräzipitation von Immediate Early Proteinen	29
2.5.6	Etablierung von Latenz und Induktion von Rekurrenz	30
2.5.6.1	Intraperitoneale MCMV-Infektion neugeborener Balb/c Mäuse	30
2.5.6.2	Immunsuppression von Mäusen durch Ganzkörpergammabestrahlung	30
2.6	Berechnungen und statistische Verfahren	30
2.6.1	Quantifizierung der lytischen Aktivität	30
2.6.1.1	Berechnung der spezifischen Lyse	30
2.6.1.2	Berechnung des Nat-Wertes	31
2.6.1.3	Berechnung des Medianwertes als Maß für die durchschnittliche lytische Aktivität replikater Einzelkulturen	31

		Seite
2.6.2	Auswertung der Limiting Dilution Experimente	32
2.6.2.1	Definition testpositiver Kulturen anhand des Toleranzlimits der Normalverteilung der Spontanlysewerte	32
2.6.2.2	Schätzung von CTL-Vorläufer Frequenzen	32
2.6.3	Chi-Quadrat Test zur Bestimmmung der Güte der Anpassung empirischer Verteilungen an Poissonverteilungen	34
2.6.4	Verteilungsfreie statistische Prüfverfahren	37
2.6.4.1	Auswertung von Vierfeldertafeln (2 x 2 Kontingenztafeln) mit dem Fisher-Yates Test	37
2.6.4.2	Signifikanzprüfung mit dem exakten Rangsummentest nach Wilcoxon (Wilcoxon-Mann-Whitney Test)	38
2.6.4.3	Rangkorrelationstest nach Spearman	39
3.	RESULTATE	41
3.1	Nachweis in vivo sensibilisierter Vorläufer MCMV-spezifischer zytolytischer T-Lymphozyten während der akuten antiviralen Immunantwort	41
3.1.1	Demonstration zweier Reifungsstadien sensibilisierter CTL-P	41
3.1.2	Beide Reifungsstadien sensibilisierter CTL-P befinden sich vorrangig in der Lymphoblastenfraktion des drainierenden Lymphknotens.	48
3.1.3	Die Expansion von IL-CTL-P beruht nicht auf Restimulation durch residuales Antigen.	54
3.1.4	Interleukin vermittelt eine homogene, klonale in vitro Expansion der in vivo sensibilisierten IL-CTL-P.	56
3.1.5	Die Generierung zytolytischer Aktivität im Expansionsprotokoll ist abhängig von der Interleukindosis.	62

		Seite
3.1.6	Funktionelle und serologische Charakterisierung der IL-CTL-P	65
3.2	Nachweis replikationsstadien-spezifischer Antigene durch zytolytische T-Lymphozyten	72
3.2.1	Voraussetzungen für die Nachweisbarkeit neu synthetisierter Antigene auf infizierten Zielzellen	72
3.2.2	Hinweise auf die Existenz eines durch Lymphozyten nachweisbaren Immediate Early Antigens	75
3.2.3	LYDIEA und membrangebundene virale Strukturantigene werden von separaten CTL Populationen erkannt.	83
3.2.4	Ein substantieller Anteil der IL-CTL-P ist spezifisch für LYDIEA.	87
3.3	Analyse der zellulären Immunität in der latenten Phase der MCMV-Infektion	90
3.3.1	Etablierung von Latenz und Induktion von Rekurrenz	90
3.3.2	Nachweis LYDIEA-spezifischer Memory-CTL in der latenten Phase der MCMV-Infektion	95
3.3.3	Nachweis LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P in der latenten Phase der MCMV-Infektion	99
4.	DISKUSSION	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	107
6.	LITERATURVERZEICHNIS	108

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Act.D	:	Actinomycin D
C	:	Complement
CH	:	Cycloheximid
ConA	:	Concanavalin A
CTL	:	cytolytic T-lymphocyte(s)
CTL-P	:	CTL-precursor(s)
CML	:	cell mediated lysis
f	:	Frequenz
H-2	:	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
I.E.	:	Immediate Early
IL	:	Interleukin
IL-CTL-P	:	Interleukin-rezeptive CTL-P
LD	:	limiting dilution
LYDIEA	:	Lymphozyten-detektiertes Immediate Early Antigen
MCMV	:	mouse cytomegalovirus
MEF	:	Murine embryonale Fibroblasten
NK	:	Natürliche Killer
pfu	:	plaque forming units
p.i.	:	post infection

1. EINLEITUNG

1.1 Die klinische Problematik latenter CMV Infektionen

Das menschliche Zytomegalovirus (human herpesvirus 5 oder human cytomegalovirus, HCMV) gehört zur Familie der Herpesviren und wird nach Roizman (1) der Unterfamilie Betaherpesvirinae zugeordnet.

HCMV ist in der menschlichen Population weltweit endemisch. Die Prävalenz ist ausgeprägt altersabhängig und wird von den sozioökonomischen Verhältnissen der untersuchten Bevölkerungsgruppe beeinflußt (2). Wie eine prospektive demographische Studie von J.B. Hanshaw über die kongenitale CMV Infektion (3) ausweist, zeigten in Rochester, New York, während eines Untersuchungszeitraums von drei Jahren im Durchschnitt 1,1% der Neugeborenen eine CMV Virurie. Die Mehrheit solcher CMV Infekte verläuft zwar klinisch asymptomatisch, jedoch zeigten 17% (8 von 47) der infizierten Neugeborenen teratogene CMV Effekte, vornehmlich im Bereich des Zentralnervensystems, davon wiederum vier eine Mikrozephalie mit schweren mentalen Defekten. Die Gesamtzahl CMV-assoziierter neurologischer Schäden wird allein für die USA mit 3700 pro Jahr angegeben (4). Die tatsächliche Inzidenz wird möglicherweise unterschätzt, da subklinische mentale Retardationen statistisch nicht erfaßt werden. Aus der CMV Prävalenz von etwa 80% in der adulten Bevölkerung (2) läßt sich das kumulative Risiko erkennen, irgendwann im Leben mit CMV infiziert zu werden.

Postnatale Infektionen verlaufen aber in der Regel klinisch inapparent, und es kommt zur Etablierung von CMV Latenz. Reaktivierung von CMV aus dem Latenzzustand im Verlauf einer Schwangerschaft kann dann zur Infektion des Fetus führen (5). Assoziiert mit einer meist tödlich verlaufenden interstitiellen Pneumonie ist CMV Rekurrenz auch der Hauptrisikofaktor, der, nach Bewältigung der immunologischen Probleme, wie der Histoinkompatibilität oder der Graft-versus-Host Disease (GvHD,

UNIV. LEIDEN

6), den möglichen Erfolg einer allogenen Knochenmarkstransplantation bei der Therapie von aplastischer Anämie (Knochenmarksaplasie) oder bestimmter Formen der akuten Leukämie limitiert (7-9). Wenn Donor und Rezipient zueinander syngen sind, ist das Risiko einer CMV-Pneumonie deutlich geringer als bei allogener Transplantation (10). Auch bei Organtransplantationen (11,12), eingehender dokumentiert für die Nierentransplantation (13-15), führen CMV Infektionen zu Komplikationen, wenngleich weniger häufig mit fatalem Ausgang. In einer unlängst publizierten Langzeitstudie berichten Meyers et al. über Befunde, die im Zeitraum von 1969 bis 1979 bei allogenen Knochenmarkstransplantationen am Fred Hutchinson Cancer Research Center und mehreren Kliniken in Seattle erhoben wurden (9). Die Stichprobe setzte sich zusammen aus insgesamt 525 Patienten, davon 356 (68%) mit Formen akuter Leukämie und 169 (32%) mit aplastischer Anämie. Die Inzidenz nichtbakterieller Pneumonien betrug 41% (215 von 525 Patienten). Daran waren virale Pneumonien mit 47% (101 von 215 Patienten) beteiligt. Alle viralen Pneumonien waren mit Herpesviren assoziiert, und zwar in 85 Fällen (84%) mit CMV, in nur 10 Fällen mit HSV und in 6 Fällen mit Varicella-Zoster. Gefolgt von idiopathischen Pneumonien mit einer Inzidenz von 12% (63 von 525 Patienten) bildete somit die CMV-Pneumonie mit einer Inzidenz von 16% (85 von 525 Patienten) die Hauptkomplikation. Diese Beurteilung wird noch bestärkt durch die mit 91% absolut höchste Mortalitätsrate bei Patienten mit CMV-Pneumonie, verglichen mit nur 75% bei den anderen Herpes-Pneumonien und nur 60% bei idiopathischen Pneumonien.

Die Inzidenz der CMV-Pneumonie erwies sich als abhängig vom Grad der Immunsuppression. Bei Patienten mit Knochenmarksaplasie und konditionierender Cyclophosphamidbehandlung war das Risiko geringer als nach Ganzkörpergammabestrahlung oder nach Behandlung mit Antithymozytenglobulin und entsprechend auch geringer als bei Leukämiepatienten, die zur Elimination der malignen Zellen prinzipiell immer bestrahlt wurden. Vor dem

Hintergrund eines offenbar eindeutigen Zusammenhangs zwischen natürlicher oder aber iatrogen induzierter Immundefizienz und CMV Rekurrenz ist die wichtige Frage naheliegend, ob anti-CMV Antikörper das Risiko einer CMV-Pneumonie herabsetzen.

Prinzipiell kann das Rekurrenzrisiko auch von den übertragenen Donorzellen ausgehen. Wie die Studie aufzeigt, ist der serologische Status des Donors, wie auch der des Rezipienten vor der Transplantation, ohne Bedeutung. Die Inzidenz von 21% (34 von 164 Patienten) in der Gruppe seropositiver Rezipienten war nicht signifikant größer, mit Sicherheit aber nicht kleiner, als die Inzidenz von 15% (39 von 252 Patienten) in der Gruppe seronegativer Rezipienten. Serokonversion nach der Transplantation setzte gleichfalls das Risiko nicht herab, sondern indizierte lediglich die CMV Rekurrenz. Natürlicherweise vorkommende Antikörpertiter können demnach CMV Rekurrenz nicht verhindern, was jedoch einen Erfolg einer passiven Immunisierung nicht notwendigerweise ausschließt. Initiativen zur Entwicklung einer CMV Vaccine wurden von Osborn zusammenfassend diskutiert (4). Durch passive Immunisierung wurde die Inzidenz der CMV Infektion zwar nicht verringert, der Infektionsverlauf wurde jedoch moduliert und das Pneumonierisiko vermindert (16).

1.2 Das murine Modellsystem

1.2.1 Parameter des Modellsystems

Die klinischen Studien belegten einen korrelativen Zusammenhang zwischen CMV Rekurrenz und letal verlaufenden interstitiellen Pneumonien. Die Diagnose einer CMV-Pneumonie stützte sich aber dabei lediglich auf die Symptome der Pneumonie in Kombination mit dem Nachweis von CMV im Lungengewebe durch Biopsie oder Autopsie (9). Der Beweis für einen kausalen Zusammenhang kann nur in geeigneten Modellsystemen erbracht werden, die planmäßige experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese

erlauben und zugänglich sind für eine Analyse der molekularen wie auch der zellulären Mechanismen, welche zur Etablierung und Aufrechterhaltung latenter Infektionen führen und speziell der Störungen solcher Mechanismen, die Virusrekurrenz zur Folge haben.

Zytomegaloviren sind strikt spezies-spezifisch. Der Infektion des Menschen kann man die Infektion der Maus mit dem murinen Zytomegalovirus als Modellsystem gegenüberstellen. Die Eignung als Modell und bisherige Befunde in diesem System wurden in mehreren Arbeiten zusammenfassend diskutiert (17-19). In den entscheidenden biologischen Parametern, wie der Etablierung einer anfänglich persistenten und dann latenten Infektion, der Induzierbarkeit von Virusrekurrenz durch Immunsuppression (20-24) sowie insbesondere der Assoziation mit einer interstitiellen Pneumonie (20,25,26), erfüllt das Modell die Bedingung der Analogie zum HCMV-System.

Im Vergleich zu HCMV und dessen hoher Prävalenz in der menschlichen Population besteht ein Vorteil des Modellsystems in der Verfügbarkeit virusfreier Maus-Inzuchtstämme, wodurch der Infektionsstatus der Versuchstiere experimentell planbar wird, echte Nullkontrollen zur Verfügung stehen und auch die akute Primärinfektion einer Analyse zugänglich ist.

1.2.2 Taxonomie und histologische Diagnose

Das murine Zytomegalovirus (murid herpesvirus 1, mouse cytomegalovirus, MCMV) gehört wie HCMV zur Unterfamilie Betaherpesvirinae der Familie Herpesviridae (1). Die Vertreter dieser Subfamilie wurden ursprünglich als Speicheldrüsenviren (salivary gland viruses, SGV) bezeichnet, da das Virus in der persistenten Phase der Infektion vorrangig in den Speicheldrüsen repliziert, wobei histologisch charakteristische, intranukleäre und zytoplasmatische Einschlußkörper in stark vergrößerten Zellen - daher die Bezeichnung Zytomegalie (27) - der serösen Acini des

Speicheldrüsengewebes auftreten (24). Brody und Craighead (2O) konnten diese Einschlußkörper am Beispiel der Infektion alveolarer Makrophagen bei der pulmonalen CID (cytomegalic inclusion disease) der Maus elektronenmikroskopisch als replikative Formen von MCMV identifizieren, nämlich als intranukleäre Nukleokapside und als verschiedene zytoplasmatische Vorstufen der Virionen.
Das Speicheldrüsenvirus der Maus, also das heutige MCMV, wurde erstmals im Jahre 1954 von M.G. Smith in Zellkultur propagiert (28).

1.2.3 Genomorganisation und Virion-Morphologie

In der vorliegenden Studie wurde für alle Infektionen der Smith Stamm ATCC VR-194 von MCMV verwendet. Das Genom dieses Stammes wurde von A. Ebeling et al. (29) in Form von Endonuklease HindIII Fragmenten im Plasmidvektor pACYC 177 in Escherichia coli HB1O1 (recA) kloniert, und die Position der Enzymschnittstellen auf dem Gesamtgenom wurde kartiert. Das Genom besteht aus einer im Virion linear und in der infizierten Zelle zirkularisiert (3O) vorliegenden DNA einer Länge von etwa $235x1O^3$ Basenpaaren, was einem Molekulargewicht von 155 Megadalton entspricht. Es gehört damit zusammen mit dem Genom von HCMV zu den größten bekannten viralen Genomen überhaupt, - größer noch als die Genome der Herpes Simplex Viren (Typ 1 und Typ 2 mit jeweils 96 Megadalton) oder als das Genom des Epstein-Barr Virus mit etwa 114 Megadalton (1). Es kommt nicht in isomeren Formen vor und enthält keine größeren Bereiche interner oder terminaler repetitiver Sequenzen (29). Darin unterscheidet sich MCMV, also das Modell, von HCMV und auch von den meisten der bislang untersuchten anderen Herpesviren. Ob allerdings diesem strukturellen Unterschied in der Genomorganisation auch eine funktionelle Bedeutung - etwa im Hinblick auf die Pathogenese - zukommt, ist noch ungeklärt. K.m at al. (31) konnten in extrazellulären Virionen des Smith Stammes von MCMV 33 Strukturpolypeptide nachweisen, von

denen mindestens 6 glykosyliert sind. Die Größe des Genoms und die hohe Anzahl an Proteinen weisen MCMV als ein äußerst komplexes Virus aus.
Die Morphologie der MCMV Virionen unterscheidet sich nicht prinzipiell von der anderer Herpesviren wie sie von Roizman zusammenfassend als Charakteristik der Familie Herpesviridae dargestellt wurde (1). Das ikosahedrale Nukleokapsid, zusammengesetzt aus 150 hexameren und 12 pentameren Kapsomeren, wird von einem Integument umgeben. Die äußere Begrenzung des Virions bildet eine Hüllmembran (envelope), die Lipide enthält und besetzt ist mit Oberflächenprojektionen, bestehend aus Proteinen und Glykoproteinen. Der erste Schritt der viralen Replikation besteht aus einer Bindung von Komponenten dieser Virusmembran an Rezeptoren der Zellmembran infizierbarer Wirtszellen. Dadurch wird die Fusion der Membranen eingeleitet, als deren Folge virale Strukturantigene in die Membran der rezeptiven Zelle integriert werden und das Nukleokapsid ins Zytoplasma freigesetzt wird.

Eine Besonderheit des MCMV-Systems ist die von gehäuftem Auftreten nichtinfektiöser, nackter Kapside begleitete Entstehung von Multikapsid-Virionen bei der in vitro Propagation von MCMV auf permissiven, embryonalen Fibroblasten (32,33). Ein Zusammenhang dieses , morphologischen Phänomens mit der schnellen Attenuierung von MCMV während Zellkulturpassagen wird diskutiert (32-34).

1.2.4 Temporales Muster von viraler Transkription und Proteinsynthese in MCMV-infizierten Zellen

Wie Honess und Roizman (35) am Beispiel der Infektion mit Herpes Simplex Viren gezeigt haben und von Spear und Roizman zusammenfassend dargestellt wurde (36), ist die virale Proteinsynthese koordiniert reguliert und kann in die drei Stadien Immediate Early (alpha, I.E.), Early (beta) und Late (gamma) eingeteilt werden. Die Synthese der I.E.

Messenger-RNA ist unabhängig von der Synthese viraler Proteine und erfolgt auch in Gegenwart des reversiblen Translationsinhibitors Cycloheximid (CH). Dabei werden sogenannte I.E. Gene, denen spezielle Promotoren, die Alpha-Promotoren, vorgeschaltet sind, unter Mitwirkung der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert. Der Übergang zur Early Transkription erfordert dann jedoch mindestens ein intaktes I.E. Protein (37), dem somit eine regulatorische Funktion zukommt. Infektion in Gegenwart von CH arretiert die virale Replikation demzufolge auf der Stufe der I.E. Transkription. Aufhebung der Translationsinhibition unter Zugabe des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D (Act. D) erlaubt dann selektiv die Synthese der I.E. Proteine und verhindert zugleich die Expression der Early und Late Genprodukte. Die Late Phase wird zeitlich definiert durch den Beginn der viralen DNA Replikation. Die Late Gene kodieren für die Mehrheit der Strukturproteine des Virions, wohingegen bei HSV nur ein Strukturprotein (ICP4) der I.E. Phase zuzuordnen ist. Die Transkription der I.E. Gene ist bei normalen Ablauf der in vitro Infektion permissiver Zellen nur gering und transient. Arretierung der Infektion durch CH führt jedoch zu einer Akkumulation von I.E. Messenger RNA, was nach Aufhebung des Blocks eine erheblich verstärkte I.E. Proteinsynthese zur Folge hat.

Diese für HSV erarbeiteten Prinzipien lassen sich auch auf MCMV übertragen. Chantler und Hudson (38) konnten in infizierten Zellen 52 neusynthetisierte Polypeptide (polypeptides in the infected cell, ICP) nachweisen, von denen 30 mit virusspezifischem Antiserum immunpräzipitierbar waren. Aus der I.E. Phase der Infektion ließen sich jedoch lediglich 3 dominante Polypeptide präzipitieren und keines konnte einem Strukturprotein des Virions zugeordnet werden. Eine physikalische Karte der Transkription des Smith Stammes ATCC VR-194 wurde von Keil et al. (39) erstellt. Der dominante Anteil der I.E. Transkription wird demnach im HindIII-K und HindIII-L

Fragment kodiert, im Bereich von O.776 bis O.815 Genomeinheiten. Eine geringe Transkription ist auch im Bereich der terminalen Fragmente E und N nachweisbar. Die Umstellung auf Early Transkription erfolgt bei produktiver Infektion zwischen 1.5 und 2 Stunden p.i. und umfaßt bereits alle Genombereiche. Die Synthese viraler DNA setzt 16 Stunden p.i. ein und definiert den Beginn der Late Phase.

1.3 Die Definition von Persistenz und Latenz

Die Problematik der Definition von Latenz wurde von Openshaw für die HSV-Latenz zusammenfassend diskutiert (4O). In der Definition der "static state" Hypothese von Roizman (41) kennzeichnet der Begriff Latenz ein Stadium der nicht produktiven Infektion fakultativ permissiver Zellen, wobei das virale Genom in diesen Zellen persistiert und unter geeigneten Bedingungen eine Reaktivierung der viralen Replikation möglich ist. Darin unterscheidet sich eine latente Infektion grundlegend von der Infektion nicht permissiver Zellen oder einer Infektion, bei der das Virus als Folge einer Immunantwort eliminiert wird. Die "dynamic state" Hypothese der Latenz postuliert dagegen eine niedrige Rate persistenter Virusproduktion. Zum gleichen Resultat wie eine dynamische Latenz führt jedoch auch eine spontane Reaktivierung in einzelnen der statisch latenten Zellen, weshalb Virusnachweis weder die statische Latenz widerlegen noch die dynamische Latenz beweisen kann. Theoretisch wäre in Systemen mit niedriger spontaner Reaktivierungsrate die statische Latenz beweisbar, vorausgesetzt der Ort der Latenz wäre bekannt und die Sensitivität des Virusnachweises wäre ausreichend, um selbst ein einziges infektiöses Virion sicher zu detektieren. Operationell spricht man deshalb bereits von Latenz, wenn mit der sensitivsten der zur Verfügung stehenden Methoden Virus an einem geeigneten Indikatorort - wie etwa der Speicheldrüse bei MCMV - nicht nachweisbar ist und entweder Rekurrenz in vivo induziert (2O-24) oder aber Virus durch in vitro Reaktivierung nachgewiesen werden kann (42,43). Als

molekularer Mechanismus der Etablierung statischer Latenz wird von den meisten Autoren (40) ein vollständiger oder partieller Block auf der Ebene der viralen Transkription diskutiert, wobei allerdings eine Reversibilität dieses Blocks postuliert werden muß, um Reaktivierung zu erklären.

Kandidaten für den Ort der Latenz sind Zellen, die sich nicht oder zumindest nur selten teilen, es sei denn das virale Genom wäre in die DNA der Wirtszelle integriert und würde bei der Replikation mitrepliziert. Dutko und Oldstone (44) konnten in in vitro Modéllsystemen einen Einfluß des Differenzierungszustandes der Wirtszelle auf die virale Replikation nachweisen. Durch chemisch induzierbare Differenzierung latent infizierter, muriner Teratokarzinomzellen konnte MCMV reaktiviert werden. Differenzierung wäre auch eine Erklärung für die Virusreaktivierung in B-Lymphozyten latent infizierter Mäuse nach in vitro Aktivierung mit dem Mitogen LPS oder mit H-2 Alloantigenen (45). Der Latenzort für MCMV ist noch nicht definitiv bekannt, wenngleich B-Lymphozyten oder Makrophagen als Kandidaten diskutiert wurden (45,46). Die Lokalisation des postulierten Transkriptionsblocks im Zyklus der viralen Replikation ist entscheidend für die Antigenität statisch latenter Zellen. Im Gegensatz zu einer vollständigen Blockade jeder viralen Transkription könnte ein partieller Block eine persistente Antigenexpression und damit eine Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes noch zulassen.

1.4 Hinweise auf eine regulatorische Funktion der zellulären Immunität bei der Etablierung von Latenz

Die klinischen Befunde beim Menschen haben bereits die Bedeutung der zellulären Immunität und die unter natürlichen Bedingungen relative Bedeutungslosigkeit der humoralen Immunität verdeutlicht (1.1). Auch im murinen Modellsystem konnte das Virus durch Immunsuppression reaktiviert werden (20-24), was eine Beteiligung des Immunsystems an der

Aufrechterhaltung der Latenz nahelegt und eine Expression von Antigenen auch während der latenten Phase der MCMV Infektion impliziert.

Mausmutanten, die das Beige-Gen homozygot tragen (bg/bg) und damit selektiv defizient sind für NK-(Natürliche Killer-)Zellen, zeigten verglichen mit den Heterozygoten (bg/+) eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit MCMV (47). Zu einem analogen Ergebnis führte der Vergleich der Suszeptibilität homozygoter, T-Zell-defizienter athymischer Nude-Mutanten (nu/nu) mit den heterozygoten, euthymischen Geschwistern desselben Wurfes (nu/+). Es muß somit ein Beitrag unspezifischer NK-Funktionen wie auch antigenspezifischer Funktionen von T-Lymphozyten zur Wirtsresistenz in der frühen Phase der Infektion angenommen werden. Allerdings ist die Erhöhung der Suszeptibilität durch eine Nude-Mutation im ohnehin genetisch suszeptiblen Stamm Balb/c ($H\text{-}2^d$) wesentlich ausgeprägter als im genetisch resistenten Stamm CBA ($H\text{-}2^k$), und darüber hinaus zeigen selbst CBA-(nu/nu) noch eine höhere Resistenz als Balb/c-(nu/+), obwohl diese T-Zell-kompetent sind. Wie Grundy-Chalmer und Melief aus diesen ihren Experimenten folgerten, wird somit offenbar die mit $H\text{-}2^k$ assoziierte Resistenz des Stammes CBA nicht von T-Zellen vermittelt, wohingegen in den anderen, genetisch suszeptiblen Haplotypen die T-Zell Immunantwort der kritische Parameter ist (48). Zum Studium des Beitrages von T-Lymphozyten zur Etablierung und Aufrechterhaltung latenter MCMV Infektionen eignet sich somit der Stamm Balb/c, nicht jedoch Stämme, welche das $H\text{-}2^k$ Allel tragen.

Die in vitro Analyse der Immunantwort während einer akuten MCMV Infektion von Balb/c Mäusen unterstützt die These von der Existenz eines dualen zellulären Abwehrsystems, bestehend aus funktionell unterscheidbaren Arten zytolytischer Effektorzellen. So konnten Quinnan et al. in der Anfangsphase der Immunreaktion die Aktivierung von genetisch nicht

restringierten NK-Zellen und antikörperabhängigen Killerzellen (K-Zellen) nachweisen (49), auf die dann eine Aktivierung H-2 restringierter zytolytischer T-Lymphozyten (CTL) folgte (50,51).

Der Begriff "Selbstrestriktion der Lyse" bezeichnet die von Zinkernagel und Doherty für die Infektion der Maus mit Lymphozytärem Choriomeningitis (LCM)-Virus beschriebene (52,53) und zusammenfassend diskutierte (54) Eigenschaft der CTL, vorrangig infizierte körpereigene Zellen zu lysieren, also virale Antigene präferentiell in Assoziation mit Determinanten der K- oder D-Region des syngenen H-2 Komplexes (55) zu erkennen. Dieser Befund lieferte ein wichtiges Argument für die Immune Surveillance Theorie von Burnet (56), in der eine Funktion der CTL bei der Erkennung und Elimination veränderter körpereigener Zellen zu einem Zeitpunkt postuliert wurde, als die einzige bekannte Funktion von CTL die Abstoßung körperfremder, allogener Transplantate war.

Eine selbstrestringierte in vivo protektive Aktivität von transferierten, in vitro generierten MCMV-spezifischen CTL während einer akuten MCMV Infektion konnte M. Ho anhand der Reduktion des Virustiters in den Milzen syngener, nicht jedoch allogener Rezipienten demonstrieren (57). Im Gegensatz zur NK-Immunantwort führt eine CTL-Immunantwort zum Aufbau eines Potentials reaktivierbarer Zellen (Immunologisches Gedächtnis, Memory). Bis zu acht Monaten nach einer akuten MCMV Infektion von Balb/c Mäusen konnten Ho und Ashman (58) Memory-CTL durch in vitro Reaktivierung nachweisen, und sie diskutierten die Bedeutung dieser Persistenz von T-Zell Immunität für die latente Infektion.

1.5 Die Immune Surveillance Theorie der Latenz als Arbeitshypothese

Wenn während einer statisch latenten Infektion von Zellen des lymphatischen Systems (45,46) infolge einer nur partiellen Blockade der viralen Transkription und Translation Antigene, die von Memory-CTL erkannt werden können, permanent exprimiert würden, so sollte dies zur Reaktivierung der Memory-CTL und damit letztlich zur Elimination der latent infizierten Zellen führen. Eine Arbeitshypothese zur Erklärung der Aufrechterhaltung von Latenz müßte in diesem Fall von einer nicht permanenten Antigenexpression ausgehen. Eine zellautonome Etablierung von Latenz an privilegierten, der Immunkontrolle nicht zugänglichen Orten erfordert dagegen keine derartigen Annahmen bezüglich der Expression viraler Produkte. Die Rekurrenz der Virusinfektion nach Immunsuppression ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß eine Immunkontrolle der Latenz tatsächlich existiert, sei es nun direkt durch Wirkung auf die latent und dann rekurrent infizierte Zelle selbst oder aber indirekt durch Verhinderung der Ausbreitung von Virus vom Rekurrenzort.

Die Immune Surveillance Theorie der Latenz postuliert eine Expression viraler Antigene als Folge einer spontanen oder auch induzierten Reaktivierung und die Elimination der rekurrent infizierten Zellen durch aktivierte Memory-CTL vor Ablauf der viralen Replikation und damit vor einer nachweisbaren Dissemination von Virus.

Als Folgerung aus dieser Theorie muß gefordert werden, daß auch während einer latenten Infektion zumindest sporadisch aktive CTL vorliegen, die für frühe virusspezifizierte Antigene spezifisch sind. Bisherige in vitro Methoden erlaubten den Nachweis von Memory-CTL durch Restimulation mit Antigen, nicht jedoch eine Unterscheidung zwischen den aktivierbaren, also noch ruhenden Memory-CTL und den durch in vivo

Antigenexpression tatsächlich aktivierten, also aktiven Memory-CTL. Schon aus diesem technischen Grund konnte ein Beweis für eine Funktion der Memory-CTL bei latenten Infektionen nicht erbracht werden.
Auch für die Annahme einer Lyse rekurrent infizierter Zellen vor Ablauf der viralen Replikation fehlt bislang die experimentelle Grundlage.

Die vorliegende Studie hat deshalb zum Ziel, zur Klärung dieser beiden Probleme einen Beitrag zu leisten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Mäuse

Zuchtpaare der Mausstämme Balb/c (Haplotyp H-2^d) und C57BL/6 (Haplotyp H-2^b) wurden vom Institut für Versuchstierforschung (Hannover) bezogen und in eigener Kolonie weitergezüchtet. Die Versuchstiere waren frei von Murinem Hepatitisvirus (MHV).
Beide Stämme tragen das Allel 2 der Lymphozytenoberflächenmarker Thy-1, Lyt-1 und Lyt-2.
Zur Analyse akuter Immunantworten wurden 6-8 Wochen alte weibliche Tiere verwendet. Das Alter der Latenztiere wird im jeweiligen Experiment angegeben.

2.1.2 Ratten

Fünf Wochen alte weibliche Sprague Dawley Ratten wurden von Firma Ivanovas (Kissleg) bezogen und direkt zur Herstellung xenogeneischer Lymphokine (Interleukine) verwendet.

2.2 Viren

2.2.1 Murines Zytomegalovirus

Murines Zytomegalovirus (mouse cytomegalovirus, MCMV), Stamm Smith (ATCC VR-194, mouse salivary gland virus), ein Herpesvirus der Unterfamilie Betaherpesvirinae (1), wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) bezogen, auf murine embryonale Fibroblasten (MEF) des Mausstammes Balb/c adaptiert und auf diesen Zellen dann propagiert. Das Virus ist somit durch Zellkulturpassagen attenuiert, revertiert jedoch zur virulenten Form während einer Speicheldrüsenpassage (59).

2.2.2 Rabiesvirus

Der klonierte ERA Stamm von Rabiesvirus (Tollwutvirus), einem Rhabdovirus, wurde ursprünglich von Dr. T.J. Wiktor, Wistar Institut Philadelphia, zur Verfügung gestellt und von Dr. J.H. Cox auf der Zellinie BHK-21 propagiert und durch Sucrosegradienten-Zentrifugation partiell gereinigt.

2.3 Kulturmedien und Kulturbedingungen

2.3.1 Expansionsmedium IL-MEM-ALPHA

Zur in vitro Vermehrung in vivo sensibilisierter Lymphozyten diente als Grundlage das Medium MEM-ALPHA ohne Ribonukleoside (Gibco Europe, Karlsruhe, Best.-Nr. 041-2561) mit folgenden Zusätzen:

- 2 mM L-Glutamin (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 289)
- 5 x 10^{-5} M 2-Mercaptoäthanol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Best.-Nr. 805740)
- 10 mM Hepes-Puffer, pH 7.2 (Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 25245)
- 100 IE/ml Penicillin (Grünenthal, Stolberg)
- 0.1 mg/ml Streptomycinsulfat (Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 35500)
- 10% v/v Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS; Seromed, München)

Das FCS war frei von Mycoplasmen und wurde vor Verwendung hitze-inaktiviert (1 Stunde bei 56°C). Alle verwendeten FCS-Chargen waren zuvor in Mikrokulturen getestet und nach dem Kriterium optimaler Unterstützung der spezifischen, interleukinabhängigen Vermehrung sensibilisierter Lymphozyten, bei gleichzeitig möglichst geringer unspezifischer Eigenaktivität, ausgewählt worden.

Zur Herstellung von IL-MEM-ALPHA wurden 8 Teile MEM-ALPHA mit 2 Teilen Interleukin (siehe Abschnitt 2.4.1) gemischt.

2.3.2 Assaymedium RPMI 1640

Der Lysetest (2.4.6.1) wurde in RPMI 1640 Medium (Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 47885) durchgeführt. Das Medium wurde supplementiert wie unter 2.3.1 beschrieben, jedoch mit nur 5% v/v FCS.

2.3.3 Mitogenmedium ConA-RPMI

Zur polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten diente das Medium RPMI 1640, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 5 x 10^{-5} M 2-Mercaptoäthanol, 2% FCS und 0.005 mg/ml des T-Zell Mitogens Concanavalin A (ConA; Pharmacia, Uppsala, Schweden, Best.-Nr. EL 13835).

2.3.4 Fibroblastenwachstumsmedium MEF-MEM

Zur Anzucht muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) wurde Minimum Essential Medium (MEM) mit Earles Salzen (Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 47360) verwendet. Das Medium wurde supplementiert wie unter 2.3.1 beschrieben, jedoch ohne 2-Mercaptoäthanol und mit nur 5% v/v FCS.
Beim Nachweis von Virus in Organhomogenaten (2.5.3.4) wurde MEF-MEM zur Prophylaxe gegen Hefekontamination mit 2.5 mg/l Amphotericin B (Fungizone- Squibb, Flow Laboratories, Bonn, Best.-Nr. 16-723) und gegen Bakterien zusätzlich zu Penicillin-Streptomycin noch mit 0.2 mg/ml Gentamycin (Biochrom, Berlin, Best.-Nr. A 2712) ergänzt.

2.3.5 Kulturbedingungen

Alle Inkubationen wurden in einem CO_2-Inkubator (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) bei 5% CO_2, 37°C und 95%

relativer Feuchte durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug für Mikrokulturen zur Generierung selbstrestringierter antiviraler CTL in der Regel sechs Tage.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Herstellung von Interleukin

Der Begriff Interleukin wird in dieser Arbeit operationell verwendet und bezeichnet die Gesamtheit der Lymphokine mit einem Molekulargewicht >14 Kilodalton im Überstand ConA aktivierter Lymphozyten. Eines dieser Lymphokine ist Interleukin 2 (T cell growth factor, TCGF).

Die Milzen von Sprague Dawley Ratten wurden steril entnommen und zur Gewinnung der lymphoiden Milzzellen (Splenozyten) durch ein Stahlmaschensieb passiert. Zur polyklonalen Aktivierung von T-Lymphozyten innerhalb der Splenozytensuspension wurden die Zellen für die Dauer von 20 Stunden in Mitogenmedium ConA-RPMI (2.3.3) kultiviert. Die Inkubation erfolgte in Plastikkulturschalen (Lux Scientific Corp., Calie, USA; 150 x 15 mm, Best.-Nr. 5212) bei einer Zelldichte von 5 x 10^6 Splenozyten/ml unter Standardbedingungen (2.3.5). Der nach zwei Zentrifugationsschritten (200 g, 10 000 g) gewonnene Kulturüberstand wurde vor Verwendung im Expansionsmedium (2.3.1) zur Elimination niedermolekularer Suppressorfaktoren (60) in einem Spectrapor Dialyseschlauch (Reichelt, Heidelberg, Best-Nr. 94582; cutoff 12-14 Kilodalton) gegen 0.15 M NaCl-Lösung dialysiert. Zur Inhibition residualer ConA Aktivität wurde das Dialysat auf 100 mM Alphamethyl-D-Mannosid (Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 4282) eingestellt.

Verschiedene Chargen von so hergestelltem Interleukin wurden in Mikrokulturen (2.4.3) getestet und nach dem Kriterium optimaler Unterstützung des Wachstums aktivierter Lymphozyten und der

Reifung zu funktionell aktiven CTL (61) selektiert. Dialysierte Präparationen und über Sephadex G-75 Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) partiell gereinigte Präparationen erwiesen sich als funktionell gleichwertig.

2.4.2 Intraplantare Infektion zur Induktion einer zellulären Immunantwort

Mäuse der Stämme Balb/c und C57BL/6 wurden lokal infiziert durch Injektion (Kanüle TSK-Supra 0.4 x 20 mm) von 10^2-10^6 pfu MCMV (2.5.3.1) in 0.1 ml 0.15 M NaCl-Lösung in die Sohle des linken Hinterfußes. In einem Zeitraum von vier Tagen bis etwa zwei Wochen nach Virusapplikation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, und die drainierenden, ipsilateralen poplitealen Lymphknoten dienten als Quelle aktivierter Lymphozyten. Als Kontrollen dienten Lymphozyten aus kontralateralen poplitealen Lymphknoten sowie aus inguinalen, axillaren, zervikalen oder mesenterischen Lymphknoten.

2.4.3 Ansatz von Mikrokulturen

2.4.3.1 Herstellung einer Lymphozytensuspension

Lymphknoten akut (2.4.2) oder latent (2.5.6) infizierter Versuchstiere wurden in Expansionsmedium IL-MEM-ALPHA (2.3.1) aufgenommen und zur Herstellung einer Lymphozytensuspension durch ein feinmaschiges Stahlsieb passiert. Die Lymphozyten wurden dreimal durch Abzentrifugieren und Resuspendieren gewaschen (5 ml PPN-Röhrchen, Greiner, Nürtingen, Best.-Nr. 115261; Wifug Zentrifuge-200 g, Bachhofer, Reutlingen), gezählt und auf eine bestimmte Anzahl Zellen/ml eingestellt. Die Zellzählung erfolgte mit einer Brand-Neubauer Zählkammer und wurde kombiniert mit dem Trypanblau-Vitalitätstest (0.25% Trypanblau in 0.15 M NaCl-Lösung; Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 37252).

2.4.3.2 Limiting Dilution Assay (Grenzverdünnungsexperiment)

Nach 2.4.3.1 gewonnene Lymphozyten, sogenannte Responderzellen, wurden in die erste Reihe einer 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen, Best-Nr. 650101) überführt und in der Platte mit einer Titertek-Multikanalpipette in Expansionsmedium IL-MEM-ALPHA (2.3.1) seriell titriert. Alle im Test eingesetzten Zellkonzentrationen waren auf jeder Platte mit zwölf replikaten Kulturen vertreten. Als Kontrolle dienten jeweils zwölf Kulturen, die alle Komponenten außer den zu testenden Lymphozyten enthielten. Zur Auswertung (2.6.2) wurden dann die Ergebnisse (2.4.6) von mindestens zwei identisch angelegten, aber unabhängigen Platten herangezogen. Ein solches Vorgehen erwies sich als notwendig, um den Einfluß von Qualitätsunterschieden einzelner Platten auf die Entwicklung der Kulturen kontrollieren zu können.
Es wurden zwei konzeptionell unterschiedliche Protokolle angewendet:

Expansionsprotokoll: Die Kulturen (0.25 ml Endvolumen) wurden auf 20% v/v Interleukin (2.4.1) eingestellt.

Restimulationsprotokoll: Die Kulturen erhielten 20% v/v Interleukin und zusätzlich Antigen in Form von

a) 10^4 MCMV-infizierten MEF/Kultur
b) 0.1-0.2 pfu MCMV/Responderzelle. Das Virus wurde zusammen mit den Zellen seriell titriert.

Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen (2.3.5).

2.4.3.3 Behandlung von Lymphozyten mit Mitomycin C zur Herstellung von Stimulatorzellen

Durch die Behandlung mit Mitomycin C wird die DNA Synthese irreversibel blockiert und damit die Proliferation der Zellen unterbunden.
Eine Lymphozytensuspension wurde auf 10^7 Zellen/ml eingestellt und mit 0.04 mg/ml Mitomycin C (Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 4150) für 45 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Ungebundenes Mitomycin C wurde durch viermaliges Waschen der Zellen entfernt. So behandelte Lymphozyten dienten dann als Stimulatorzellen in Mikrokulturen (Tabelle 3).

2.4.4 Physikalische Trennung von Lymphozyten durch Dichtestufengradienten - Zentrifugation nach dem Flotations-Sedimentationsverfahren

In Populationen sensibilisierter Lymphozyten wurden Lymphoblasten und dichte Lymphozyten über einen Percoll Dichtestufengradienten nach dem Flotations-Sedimentations-verfahren (62) getrennt. 6 x 10^7 Lymphozyten wurden in 6 ml iso-osmotischem Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden, Best.-Nr. 2907) der gewünschten Trenndichte aufgenommen, in einem transparenten 10 ml Polystyrol-Röhrchen (Greiner, Nürtingen, Best.-Nr. 163160) auf ein Dichtekissen (2 ml; rho = 1.09 g/ml) aufgeschichtet und mit Percoll geringerer Dichte (2 ml; rho = 1.03 g/ml) überschichtet. Nach Zentrifugation (1250 g, 45 Minuten; Beckman TJ-6 Tischzentrifuge mit Rotor TH-4) wurden die getrennten Fraktionen mit einer Pasteurpipette abgehoben, gewaschen, gezählt und zur funktionellen Analyse in Mikrokulturen als Responderzellen eingesetzt.

2.4.5 Charakterisierung von T-Lymphozyten anhand von Oberflächenmarkern

2.4.5.1 Monoklonale Antikörper und Complement

Alle Hybridome wurden freundlicherweise von Frau Dr. C. Mark und Dr. Z.A. Nagy, Max Planck Institut für Biologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt.
Das Hybridom C3PO (63) produziert monoklonalen anti-Lyt-1.2 IgM Antikörper. Der Kulturüberstand wurde 1:10 verdünnt eingesetzt (zytotoxischer Titer 1:3600). Der Kulturüberstand des Hybridoms 19-178 (ursprünglich erhalten von Dr. U. Hämmerling, Sloan-Kettering Institute, New York, USA) enthält monoklonalen anti- Lyt-2.2 Antikörper und wurde unverdünnt verwendet (zytotoxischer Titer 1:380).
Das Hybridom HO-13-4 (64) produziert monoklonalen anti-Thy-1.2 IgM Antikörper und der Kulturüberstand wurde 1:10 verdünnt eingesetzt (zytotoxischer Titer 1:5500).
Der zytotoxische Titer wurde ermittelt aus der halbmaximalen Aktivität gegen 51-Cr markierte Balb/c Thymozyten im direkten Lysetest mit Antikörper und Complement. Die verwendeten monoklonalen Antikörper zeigten keine Eigenaktivität gegen Thymozyten oder periphere Lymphozyten.

Als Complement-Quelle diente das Normalserum von Kaninchen. Verschiedene Chargen wurden selektiert nach dem Kriterium hoher Complementaktivität bei gleichzeitig möglichst geringer Eigenzytotoxizität. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:25 verwendet.

2.4.5.2 Depletion von Populationen sensibilisierter Lymphozyten vor in vitro Expansion

Sensibilisierte Lymphozyten (2.4.2 und 2.4.3.1) wurden bei einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml zwei Behandlungszyklen unterworfen. Jeder Zyklus bestand aus einer Phase der

Antikörperadsorption (1 ml Hybridomüberstand, 15 Minuten, $4^{o}C$), gefolgt von der Lyse in Gegenwart von Complement (1 ml, 30 Minuten, $37^{o}C$). Die depletierten Populationen wurden gewaschen, neu gezählt und in Expansionsmikrokulturen (2.4.3.2) funktionell getestet.

2.4.5.3 Bestimmung des Phänotyps der Effektor-CTL

Mikrokulturen, die, nach in vitro Expansion sensibilisierter Lymphozyten, nunmehr Klone funktionell aktiver CTL enthielten, wurden mit einer Titertek-Multikanalpipette in fünf Aliquots (0.04 ml) geteilt und diese korrespondierend auf Tochterplatten überführt. Zwei Behandlungszyklen mit jeweils 0.05 ml Antikörper und 0.05 ml Complement wurden in den Mikrotiterplatten durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen gewaschen, indem sie abzentrifugiert (600 g-10 Minuten; Beckman TJ-6/TH-4 Tischzentrifuge mit Plattenträger) und in 0.1 ml Assaymedium (2.3.2) resuspendiert wurden.

2.4.6 Nachweis zytolytischer Effektorzellen

2.4.6.1 Radioaktive Markierung von Zielzellen und Test der zellvermittelten Lyse (CML-Assay)

Der Test der zellvermittelten Lyse (cell-mediated lysis-, CML-Assay) wurde mit geringfügigen technischen Modifikationen nach etablierten Methoden (65-68) durchgeführt. Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Effektor-CTL in den Mikrotiterplatten durch Abzentrifugieren und Resuspendieren in 0.1 ml Assaymedium gewaschen. Unter verschiedenen Bedingungen infizierte MEF (2.5.4), nichtinfizierte MEF oder Balb 3T3 Fibroblasten wurden nach Ablösung mit Trypsin-Versen (1-2 Minuten, $20^{o}C$; 0.25% Trypsin, 0.125% EDTA) in Suspension mit 0.1 mCi 51-Cr pro 10^{6} Zellen (0.1 ml 51-Cr-Natriumchromat gelöst in PBS, spezifische Aktivität 0.6

Ci/mg; Amersham Buchler, Braunschweig) und O.1 ml Assaymedium für zwei Stunden inkubiert, gewaschen, gezählt und auf 10^3 Zellen/O.1 ml eingestellt. Die Effizienz der Markierung beträgt bei diesem Verfahren, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, etwa 1.6-3.2 cpm/Zelle.
Nach Zugabe von 10^3 markierten Zielzellen zu jeder Kultur wurden die Mikrotiterplatten anzentrifugiert (100 g - 5 Minuten) und für drei Stunden unter Standardbedingungen (2.3.5) inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (600 g - 10 Minuten), und O.1 ml Überstände der einzelnen Kulturen wurden zur Messung der freigesetzten Radioaktivität (51-Cr Release) mit einer Titertek-Multikanalpipette in Luckham Röhrchen (Luckham Ltd., Burgesshill, England, Best.-Nr. 296-O28) überführt und gezählt (Auto Gamma 800 C, Packard). Die Spontanlyse (low control, LC) betrug 10-20% der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität (high control, HC). Der Lysetest wurde gemäß 2.6.1 ausgewertet.

2.4.6.2 CML-Assay in Gegenwart von Concanavalin A

Der CML-Assay in der Durchführung nach 2.4.6.1 detektiert lediglich solche CTL, die spezifisch sind für Membranantigene auf den jeweils angebotenen Zielzellen. Zur Erfassung der gesamten lytischen Aktivität einer polyspezifischen CTL Population und zur Ermittlung der Gesamtzahl der in vivo aktivierten IL-CTL-P muß diese Antigenspezifitätsrestriktion der Lyse umgangen werden. Dies wird erreicht durch Vernetzung von Effektorzellen und Zielzellen mit dem tetrameren Lectin Concanavalin A.

Hierzu wurde die Zielzellsuspension (2.4.6.1) unmittelbar vor Zugabe zu den Effektorzellen auf O.O4 mg ConA/ml (Pharmacia) eingestellt. Die Endkonzentration während der Lyse betrug demnach O.O2 mg ConA/ml.

2.5 Virologische und immunchemische Methoden

2.5.1 Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden hergestellt aus 15-17 Tage alten Balb/c oder C57BL/6 Embryonen durch Trypsinierung mit Trypsin-Versen (0.25% Trypsin, Difco, Best.-Nr. 0152-17-7; 0.125% EDTA, Sigma, Best.-Nr. 119C-0530) und nachfolgende Selektion von Fibroblasten durch Aussaat und zwei Kulturpassagen in MEF-MEM (2.3.4) für jeweils 4-6 Tage unter Standardbedingungen (2.3.5). MEF wachsen adhärent und bilden bei einer Aussaatdichte von 10^5 Zellen/ml nach etwa 24 Stunden ein konfluentes Monolayer.

2.5.2 Anzucht und partielle Reinigung von MCMV

MEF aus der zweiten Kulturpassage (2.5.1) wurden mit einer Dosis von 0.01 pfu MCMV/Zelle infiziert, und der Kulturüberstand (Titer etwa 10^6 pfu/ml) wurde nach 4-6 Tagen geerntet. Zur partiellen Reinigung und Konzentrierung dienten drei Zentrifugationsschritte: Zelldebris wurde bei 7000 g in einem Beckman JA 10 Rotor entfernt und das Virus wurde anschließend in einem Beckman JA 14 Rotor pelletiert (17000 g - 3 Stunden). Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen PBS-A (phosphate buffered saline, PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert. Die Virussuspension wurde auf ein 15% Sucrose-PBS-A Kissen geschichtet und in einem Beckman SW 41 Rotor (68000 g - 1 Stunde) erneut pelletiert, in Sucrose-PBS-A resuspendiert, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die in den Experimenten verwendete Virus-Charge enthielt 1.6 x 10^8 pfu MCMV/ml und war frei von Mycoplasmen.

2.5.3 Virusnachweis und Titerbestimmung durch Plaque-Tests

2.5.3.1 Konventionelle Bestimmung des Virustiters

Nach 2.5.1 hergestellte präkonfluente MEF sind permissiv für eine produktive MCMV Infektion in vitro und können somit als Indikatorzellen dienen. Es ist entscheidend, daß sich die MEF zum Zeitpunkt der Infektion nicht in der Go-Phase des Zellzyklus befinden (69).
Nach 2.5.2 gewonnenes Infektionsvirus wurde in 24-Well Kulturplatten (Costar, Cambridge, Mass., USA, Best.-Nr. 3524) auf präkonfluenten MEF in log10-Stufen titriert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, 0.1 ml Virussuspension der jeweiligen Verdünnung zugegeben und zur Adsorption für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Monolayer gewaschen, mit 1 ml Methylzellulose (Methocel-4000, Fluka, Buchs, Schweiz, Best.-Nr. 64630) überschichtet und für 3-4 Tage inkubiert. Die Methylzellulose verhindert die Entstehung von Sekundärplaques durch Virusdissemination. Die Primärplaques wurden unter einem Invertmikroskop (Leitz-Diavert, Leitz, Wetzlar) ausgezählt.

2.5.3.2 Nachweis produktiv infizierter Zellen durch Kokultivation mit MEF Indikatorzellen (Infectious Center Test)

Nach 2.4.2 aktivierte Lymphknotenzellen wurden mehrfach gewaschen und zum Nachweis produktiv infizierter Zellen für 3-4 Tage zusammen mit präkonfluenten MEF in Petrischalen (6 cm Ø; Greiner, Nürtingen, Best.-Nr. 628160) unter Standardbedingungen (2.3.5) inkubiert.

2.5.3.3 Technik der zentrifugalen Infektion

In Abwandlung von 2.5.3.1 wurden die Platten nach Zugabe der Virussuspensionen für 30 Minuten bei 800 g zentrifugiert

(Beckman TJ-6/TH-4 Tischzentrifuge mit Plattenträger) und danach für weitere 30 Minuten inkubiert. Durch eine solche zentrifugale Infektion wird die Sensitivität des Virusnachweises um den Faktor 20-80 erhöht (centrifugal enhancement of infectivity, 70). Die Virusdosis wird nach 2.5.3.1 angegeben, die effektive Multiplizität der Infektion errechnet sich jedoch aus dem zentrifugalen Titer.

2.5.3.4 Virusnachweis und zentrifugale Titerbestimmung in Organen akut, persistent oder rekurrent infizierter Mäuse

Die Lungen, Milzen und Speicheldrüsen infizierter Balb/c Mäuse wurden in Amphotericin-MEM (2.3.4) aufgenommen, bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut und durch ein Stahlsieb passiert. Zur Inhibition von Proteasen wurden die entstandenen Suspensionen auf 1 mM PMS-F (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, Serva, Heidelberg, Best.-Nr. 32395) eingestellt, und die Zellen wurden in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Die so gewonnenen Organhomogenate wurden nach geeigneter Vorverdünnung auf präkonfluenten MEF in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten (Costar, Cambridge, Mass., USA, Best.-Nr. 02139) seriell titriert, wobei auf jeder Titerstufe 12 replikate Kulturen angelegt wurden. Nach zentrifugaler Infektion wurden die Platten für 2-5 Tage inkubiert, wobei das Medium Amphotericin-MEM täglich gewechselt wurde. Die Auswertung erfolgte nach dem Prinzip der Grenzverdünnungsexperimente anhand der Poisson-Verteilung virusnegativer Kulturen. Der Organtiter wurde nach dem Maximum Likelihood Verfahren (2.6.2.2) berechnet.

Als sensitivster Virusnachweis diente die zentrifugale Infektion von MEF in einer Petrischale (6 cm Ø; Greiner) mit 50% des unverdünnten Organhomogenats. Wenn kein Plaque nachweisbar war (Titer <10 pfu), wurde das Organ als virusnegativ gewertet.

2.5.4 Virusinfektion von MEF zur Herstellung von Stimulatorzellen und Zielzellen

2.5.4.1 Infektion von MEF mit Rabiesvirus

Die Infektion von MEF mit Rabiesvirus (Stamm ERA) erfolgte mit einer Multiplizität von 10 pfu/Zelle während 20-24 Stunden Inkubation. Zur Verbesserung der Virusadsorption wurde dem Medium MEF-MEM 0.1 mg/ml DEAE-Dextran (Pharmacia) zugesetzt. Die Effizienz der Infektion wurde durch direkte Immunfluoreszenz geprüft und betrug stets nahezu 100%. (Die Arbeiten mit Rabiesvirus wurden von Dr. J.H. Cox und Frl. M. Schwarz durchgeführt.)

2.5.4.2 Infektion von MEF mit MCMV zur Herstellung der Zielzellen Late-MEF und Early-MEF

Präkonfluente MEF der zweiten Kulturpassage (2.5.1) wurden als Monolayer in Petrischalen mit einer nach 2.5.3.1 definierten Virusdosis von 0.05 pfu MCMV/Zelle zentrifugal infiziert (2.5.3.3). Erste zytopathische Effekte treten nach einigen Stunden auf, erkennbar an einer Abrundung der Zellen. Die virale DNA Synthese setzt 16 Stunden p.i. ein (39) und definiert den Beginn der Late-Phase der Infektion, während der die Mehrheit der viralen Strukturproteine synthetisiert wird. Early-MEF waren bei Zugabe zu den Effektorzellen (2.4.6.1) nur 12 Stunden infiziert, Late-MEF dagegen 24 Stunden. Bei der als MCMV-MEF bezeichneten Zielzelle handelt es sich stets um Late-MEF.

2.5.4.3 Infektion von MEF mit MCMV und Behandlung mit den metabolischen Inhibitoren Cycloheximid und Actinomycin D zur Herstellung der Zielzelle Immediate Early - MEF

Zur Verhinderung von Proteinsynthese wurden die zentrifugale

Infektion (0.05-0.2 pfu MCMV/Zelle) und die nachfolgende dreistündige Inkubation in Gegenwart des reversiblen Translationsinhibitors Cycloheximid (CH, 0.05 mg/ml; Sigma, München, Best.-Nr. C 6255) durchgeführt. Danach wurde CH quantitativ ausgewaschen und das Monolayer für weitere zwei Stunden inkubiert, wobei nunmehr dem Assaymedium zur Verhinderung von Transkription der irreversible RNA Polymerase-Inhibitor Actinomycin D (Act.D, 0.005 mg/ml; Sigma, München, Best.- Nr. A 4262) zugesetzt wurde. Diese Bedingungen erlauben selektiv nur die Expression von Immediate Early-Proteinen. Der CML-Assay wurde dann durchgeführt wie unter 2.4.6 beschrieben.

2.5.4.4 UV-Bestrahlung von MCMV zur Herstellung scheininfizierter MEF

Die UV-Inaktivierung von MCMV wurde durch Bestrahlung für 5 Minuten bei 254 nm mit einem UV-Illuminator (RU-VE Chroma 41, Vetter, Wiesloch) durchgeführt. Der Abstand der Probe von der Quelle betrug 5 cm, die Schichthöhe der Virussuspension 1 mm. Die Effizienz der Bestrahlung wurde funktionell durch Bestimmung der Titerreduktion und anhand der viralen Proteinsynthese in MEF kontrolliert. Je nach Intention des Experimentes wurden MEF unter Bedingungen der zentrifugalen Infektion entweder zur Herstellung von Strukturantigen-Zielzellen (S-MEF) mit bis zu 4 pfu UV-MCMV beladen oder zur Herstellung von Kontrollzielzellen mit 0.05 - 0.2 pfu UV-MCMV scheininfiziert und anschließend entsprechend der tatsächlich infizierten Zielzelle weiterbehandelt.

2.5.5 Analyse der Proteinsynthese in MCMV-infizierten MEF

2.5.5.1 Gewinnung von MCMV-spezifischem Antiserum

Serum von 4-6 Wochen alten Balb/c Weibchen diente als Präimmunserum in der Immunpräzipitation (2.5.5.2). Zur

Immunisation wurden dieselben Tiere in einem Abstand von jeweils zwei Wochen dreimal mit 10^5 pfu MCMV intraperitoneal infiziert. Das zwei Wochen nach der letzten Infektion gewonnene Serum wurde als Immunserum verwendet.

2.5.5.2 Immunpräzipitation von Immediate Early Proteinen

Zur Biosynthesemarkierung wurden infizierte MEF nach Aufhebung des Cycloheximid Blocks (2.5.4.3) für vier Stunden in Methionin-freiem MEF-MEM inkubiert, dem 1.25 mCi/ml 35-S-Methionin (Amersham, Braunschweig) und zur Inhibition der Transkription 0.005 mg/ml Actinomycin D zugesetzt worden waren. Danach wurden die Zellen durch Beschallung in Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCL, pH 7.5, in 150 mM NaCl mit 1% Natriumdeoxycholat, 1% NP40, 0.1% SDS, 2 mM L-Methionin, 1 mg/ml Ovalbumin und 1 mM PMS-F) lysiert, und die Lysate wurden bei 40 000 rpm (60 Minuten, 4^oC) in einem Beckman 50 ti Rotor zentrifugiert. Überstände in Aliquots von 1 x 10^6 cpm wurden mit 0.01 ml Antiserum oder Präimmunserum (2.5.5.1) inkubiert (60 Minuten bei 20^oC und dann 60 Minuten auf Eis). Die Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 0.05 ml Staphylococcus aureus (Pansorbin, Calbiochem, Giessen) präzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und dann in Probenpuffer (62.5 mM Tris- HCL, pH 6.8, 3% SDS, 10% Sucrose, 5% 2-Mercaptoäthanol und 0.01% Bromphenolblau) für 5 Minuten bei 95^oC gelöst. Dieses Material wurde in 10% SDS-Polyacrylamid Flachgelen analysiert. Zur Fluorographie wurden die Gele mit En^3Hance (New England Nuclear) prozessiert, und die Banden wurden mit Kodak x-Omat R Filmen aufgenommen.

2.5.6 Etablierung von Latenz und Induktion von Rekurrenz

2.5.6.1 Intraperitoneale MCMV-Infektion neugeborener Balb/c Mäuse

Balb/c Mäuse wurden einen Tag nach der Geburt mit 10^2 pfu MCMV in 0.05 ml 0.15 M NaCl intraperitoneal infiziert. Nach vier bis sechs Monaten war in den Überlebenden eine latente MCMV-Infektion etabliert.

2.5.6.2 Immunsuppression von Mäusen durch Ganzkörpergammabestrahlung

Latent infizierte Balb/c Weibchen (2.5.6.1) wurden durch eine 137-Caesium Gammastrahlenquelle (HWM-D 2000 Kammerbestrahlungsanlage, 132.5 rad/Minute; Wälischmiller, Markdorf) mit der subletalen Dosis (LD 50/30) 600 rad bestrahlt. Zur Prophylaxe gegen Sekundärinfektionen enthielt das Trinkwasser der bestrahlten Tiere und auch das der Kontrolltiere 0.3 g/l Chlortetracyclin- HCL (Aureomycin; Lederle-Cyanamid, Wolfratshausen, Best.-Nr. 8744-47). Das Aureomycin-Wasser wurde täglich gewechselt. Definitionsgemäß erliegen im Durchschnitt der Experimente 50% der Tiere innerhalb von 30 Tagen den Folgen der Bestrahlung. Vierzehn Tage nach Bestrahlung wurde entsprechend 2.5.3.4 rekurrentes MCMV in Organen nachgewiesen.

2.6 Berechnungen und statistische Verfahren

2.6.1 Quantifizierung der lytischen Aktivität

2.6.1.1 Berechnung der spezifischen Lyse

Die spezifische 51-Cr Freisetzung (specific 51-Cr release, P) wird berechnet nach der Formel:

(Testwert - LC)/(HC - LC) x 100% = % spezifische Lyse, P

Dabei bedeutet LC (low control) die spontane 51-Cr Freisetzung aus Zielzellen ohne Einwirkung von Effektorzellen (Spontanlyse) und HC (high control) die von den Zielzellen aufgenommene Radioaktivität. Die Einheit der Meßwerte ist 1 cpm (count per minute).

2.6.1.2 Berechnung des Nat-Wertes

Der Nat-Wert wird abgeleitet vom P-Wert (2.6.1.1) nach der Formel:

$$Nat = -\ln(1-P) \quad \leftrightarrow \quad P = 1-e^{-Nat}$$

Dabei bedeutet N die Anzahl der Zellen in einer Effektorzellkultur, wobei die tatsächliche Anzahl lytisch aktiver Effektorzellen mit Spezifität für die zu testende Zielzelle nicht experimentell bekannt ist. Der Wert t bedeutet die experimentell festgelegte Dauer der Lyse und a (alpha) eine Konstante, die der Frequenz der Effektorzellen proportional ist. Im Gegensatz zum P-Wert ist somit der Nat-Wert proportional zur Anzahl der Effektorzellen. Die Theorie zum Nat-Wert ist von R.G. Miller und M. Dunkley (67) in einer Arbeit über die quantitative Analyse des 51-Cr Freisetzungstests entwickelt worden.

2.6.1.3 Berechnung des Medianwertes als Maß für die durchschnittliche lytische Aktivität replikater Einzelkulturen

Die P-Werte (2.6.1.1) replikater Kulturen werden in aufsteigender Folge der Größe nach geordnet in Rangpositionen 1 bis N. Für geradzahlige N ist der P-Medianwert definiert als das arithmetische Mittel der P-Werte der Rangpositionen N/2 und N/2 + 1. Im Gegensatz zum Mittelwert, der eine Normalverteilung der Daten voraussetzt, ist der Medianwert verteilungsunabhängig und wird weniger durch Extremwerte beeinflußt.

2.6.2 Auswertung der Limiting Dilution Experimente

2.6.2.1 Definition testpositiver Kulturen anhand des Toleranzlimits der Normalverteilung der Spontanlysewerte

Das Prinzip der Limiting Dilution Experimente erfordert eine Unterscheidung zwischen testpositiven und testnegativen Kulturen. Eine Kultur wird als testpositiv gewertet, wenn der P-Wert (2.6.1.1) mit einem Irrtumsrisiko von $p<0.01$ der Normalverteilung der Spontanlysedaten nicht angehört. Das 99% Toleranzlimit (TL) wird berechnet nach der Formel:

$$TL = \text{Mittelwert LC} + t(n-1,\ a/2 = 0.01) \times SD \times (1 + 1/n)^{0.5}$$

Dabei bedeutet n die Anzahl der LC Replikate, a die gewünschte Signifikanzgrenze, SD die Standardabweichung und t den Wert aus der Student t-Verteilung für n-1 Freiheitsgrade.
Eingesetzt in die Berechnung von 2.6.1.1 läßt sich TL als P-Wert ausdrücken. Bei Verwendung von TL als Nachweisgrenze werden statistisch begründete falschpositive Beurteilungen mit definierter Sicherheit ausgeschlossen, nicht jedoch falschnegative Beurteilungen. Die in 2.6.2.2 berechneten Frequenzen von CTL-Vorläufern sind deshalb stets als Minimalschätzungen zu verstehen.

2.6.2.2 Schätzung von CTL-Vorläufer Frequenzen

Die Theorie der Limiting Dilution Experimente hat die Poisson-Statistik zur Grundlage. Die Anwendung auf immunologische Problemstellungen und insbesondere zur Bestimmung der CTL-Vorläufer (CTL-precursor, CTL-P) Frequenzen ist in den Arbeiten von Miller et al. (71,72) sowie von Lefkovits und Waldmann (73) dargelegt.

Bei der seriellen Titration von Responderzellen (? 4.3.2) werden CTL-P, welche mit der zur ermittelnden Häufigkeit in der

Responderpopulation vertreten sind, ausverdünnt. Die Verteilung der CTL-P auf die replikaten Kulturen gehorcht auf jeder Titrationsstufe der Poisson-Statistik und läßt sich theoretisch als Poissonverteilung mit dem Parameter Lambda (L) beschreiben:

$$F(K) = L^K \times e^{-L}/K!$$

,wobei F den Anteil an Kulturen angibt, welche mit der Anzahl K (O,1,2 ...) CTL-P belegt wurden. Eine Kultur kann am Ende der Kulturperiode nur dann detektierbare CTL (2.4.6.1) enthalten, wenn sie beim Ansatz (2.4.3.2) mit mindestens einem CTL-P belegt wurde. Experimentell lassen sich nach 2.6.2.1 am einfachsten testpositive Kulturen ($K \geq 1$) von testnegativen Kulturen ($K = O$) unterscheiden.
Die Poissongleichung nullter Ordnung ($K = O$) kann als Geradengleichung formuliert werden:

$$F(O) = e^{-L} \leftrightarrow L = -\ln F(O)$$

Es befindet sich demnach im Mittel genau 1 CTL-P ($L = 1$) in jeder Kultur, wenn gilt:

$$F(O) = 1/e = O.368$$

Für jede Titrationsstufe wird der Anteil F(O) negativer Kulturen bestimmt und in einem Diagramm -ln F(O) auf der Ordinate gegen die Anzahl eingesetzter Responderzellen auf der Abszisse abgetragen. Die sich so ergebende Ursprungsgerade schneidet die zur Abszisse parallele Gerade durch 1/e in einem Punkt, dessen Abszissenwert den Reziprokwert der gesuchten CTL-P Frequenz darstellt.
Eine exakte Berechnung der Frequenz, einschließlich der 95% Vertrauensgrenzen (confidence limits, CL), sowie ein Test für das Zutreffen der Hypothese der Poissonverteilung wird durch zwei voneinander unabhängige Methoden ermöglicht, und zwar durch das Maximum Likelihood (ML) Verfahren (74) und das Minimum Chi- Quadrat (MC) Verfahren (75). Entsprechend dem

Vorschlag von Taswell (75) wurde eine Frequenzschätzung bei einer Wahrscheinlichkeit von p >O.O5 und einer ML-MC Abweichung von <1O% akzeptiert. In den Tabellen und Abbildungen sind in der Regel die MC-Schätzungen angegeben. Alle Berechnungen wurden auf einem Commodore CBM Modell 4O32/8O Mikrocomputer mit in der Sprache BASIC geschriebenen Programmen durchgeführt.

2.6.3 Chi-Quadrat Test zur Bestimmung der Güte der Anpassung empirischer Verteilungen an Poissonverteilungen

Das Verfahren soll anhand des konkreten Beispiels aus Abbildung 6 B exemplarisch erläutert werden. Im CML-Assay (2.4.6.1) wurde ursprünglich eine stetige empirische Verteilung von insgesamt 72 cpm-Meßwerten (N = 72) aufgenommen, die in eine nach wie vor stetige Verteilung von Nat-Werten (2.6.1.2) transformiert wurde. Durch Definition von Klassen einer zu variierenden Klassengröße wurden die Daten klassifiziert und damit zu gruppiert-ordinalen Daten, die eine diskrete Häufigkeitsverteilung bilden. Entscheidend ist, daß sich aus einer einzigen stetigen Verteilung mit Hilfe der Klassengröße als einer Variablen viele diskrete Verteilungen derselben Eingangsinformation bilden lassen. Es gilt nun zu ermitteln, welche dieser diskreten Verteilungen als Poissonverteilungen interpretiert werden können.

Im genannten Beispiel erhält man bei einer gewählten Klassengröße von 4 Nat zehn belegte Ränge (Klassen, K) mit folgenden beobachteten Klassenhäufigkeiten (B):

K	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B	4	11	23	12	12	4	1	1	1	3

Daraus schätzt man den Poissonparameter Lambda (L) nach der

Formel:

L = (Summe K x B)/ N

Resultat: L = 2.90

Unter der Annahme des Vorliegens einer Poissonverteilung mit dem Parameter L = 2.90 ermittelt man nun die erwarteten Klassenhäufigkeiten (E) anhand der Poissongleichung:

$E(K) = N\, e^{-L}\, L^{K}/K!$

K	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B	4	11	23	12	12	4	1	1	1	3
E	3.96	11.49	16.66	16.1	11.68	6.77	3.29	1.36	0.49	0.16

Entsprechend einer Regel, modifiziert nach Finney (76), müssen Klassen mit Erwartungswerten <5 zusammengefaßt werden.

K	1	2	3	4	5	Rest
B	11	23	12	12	4	10
E	11.49	16.66	16.10	11.68	6.77	9.30

Die Prüfgröße Chi^2 errechnet sich dann nach der Formel:

$Chi^2 = \text{Summe } (B-E)^2/E$ (77)

Resultat: $Chi^2 = 4.67$

Da ein Parameter, nämlich Lambda, geschätzt wurde, ermittelt man die Zahl der Freiheitsgrade FG über die Anzahl gewerteter Klassen nach der Beziehung:

$FG = K - 2$

Für geradzahliges FG läßt sich die Überschreitungswahrscheinlichkeit p (probability) exakt berechnen nach der Formel:

$$p = \text{Summe } e^{-m} m^x/x! \qquad \text{von } x = o \text{ bis } x = n-1$$

,wobei $m = Chi^2/2$ und $n = FG/2$

am konkreten Beispiel gilt:

$m = 2.335$, $n = 2$

$$p = e^{-2.335} + e^{-2.335} \times 2.335 = O.32$$

Für ungeradzahliges FG ist die Berechnung exakter Wahrscheinlichkeiten erheblich komplizierter und wurde mit einem Computerprogramm durchgeführt, dessen Rationale hier nicht wiedergegeben wird.

Die Hypothese der Poissonverteilung (Nullhypothese) wird nicht verworfen für FG >1 und p >O.O5. Die vorliegende empirische Verteilung aus , Abbildung 6 B kann demzufolge als eine Poissonverteilung interpretiert werden.

2.6.4 Verteilungsfreie statistische Prüfverfahren

2.6.4.1 Auswertung von Vierfeldertafeln (2 x 2 Kontingenztafeln) mit dem Fisher-Yates Test

Mit dem exakten Wahrscheinlichkeitstest nach R.A. Fisher und F. Yates (78) werden unabhängige Verteilungen von Alternativdaten verglichen.

Eine konkrete Anwendung wird in Tabelle 10 A-C gezeigt. Es wird gefragt, ob in latent infizierten Versuchstieren (R+L) durch Ganzkörperbestrahlung (R) Rekurrenz von Virus induziert werden kann. Folgerichtig dient der Nachweis von Virus in Organen als das Merkmal, anhand dessen die Versuchstiere in Plus und Minus kategorisiert werden. Von einer Grundgesamtheit aus N Versuchstieren wird nur ein Teil (R) der experimentellen Behandlung ausgesetzt, der andere Teil (L) stellt die Kontrolle. Aus dem Virusnachweis resultieren beobachtete Häufigkeiten, die sich darstellen lassen als Kontingenztafel (Inzidenzmatrix) der Form:

	R	L	Summe
+	a	b	a+b
-	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	a+b+c+d

Die Nullhypothese (Hypothese der unabhängigen Verteilung), formuliert für den konkreten Fall, besagt, daß die viruspositiven Versuchstiere a+b vor der Bestrahlung bereits positiv waren und rein zufällig auf die Gruppen R und L aufgeteilt wurden. Dieser Fall ist biologisch möglich. Die Nachweisbarkeit von Virus würde dann Persistenz oder Spontanrekurrenz indizieren. Die Alternativhypothese besagt dagegen, daß die Häufigkeit a des Auftretens von Virus in der Behandlungsgruppe R nicht als Folge einer zufälligen Verteilung interpretiert werden kann, sondern nur als Folge der Behandlung zu erklären, also im Sinne der Fragestellung signifikant ist. Die Punktwahrscheinlichkeit w für das Auftreten der beobachteten Vierfelder-Verteilung

errechnet sich nach der Formel:

$$w = (a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!/(a+b+c+d)!\ a!\ b!\ c!\ d!$$

Zur Ermittlung der Überschreitungswahrscheinlichkeit p müssen die Werte w aller extremeren Felderverteilungen, einschließlich der beobachteten Verteilung, aufsummiert werden. Dazu errechnet man den Erwartungswert für die Häufigkeit a nach der Formel:

$$Ea = (a+c)(a+b)/(a+b+c+d)$$

Für den Fall $a > Ea$ und $a+b \leq a+c$ konstruiert man die extremeren Felderverteilungen unter Beibehaltung der Randsummen für a+1 bis maximal a+b. Für den Fall $a > Ea$ und $a+b > a+c$ dagegen für a+1 bis maximal a+c, sowie für $a < Ea$ für a-1 bis minimal Null.

Die Nullhypothese wird mit dem Irrtumsrisiko p verworfen und entsprechend die Alternativhypothese mit dem Risiko p akzeptiert für $p < 0.05$ (einseitig). Dabei ist $p = 0.05$ das durch Konvention festgelegte Signifikanzniveau.

2.6.4.2 Signifikanzprüfung mit dem exakten Rangsummentest nach Wilcoxon (Wilcoxon-Mann-Whitney Test)

Dieser verteilungsfreie Test ist dann anzuwenden, wenn unabhängige Meßreihen verglichen werden sollen, deren stetige Meßwerte nicht parametrisch ausgewertet werden können, weil sie entweder definitiv nicht-normal verteilt sind oder aber es ungewiß ist, ob sie normal verteilt sind (79). Ein Problem dieser Art stellt sich in Abbildung 19 bei Vergleich der Versuchsgruppen A und B. Die zu prüfende Nullhypothese besagt, daß die Gruppen A und B mit Stichprobenumfang N einer Grundgesamtheit angehören und ein beobachteter quantitativer Unterschied auf zufälliger Verteilung beruht. Dagegen postuliert die Alternativhypothese einen signifikanten

Einfluß der experimentellen Behandlung auf Gruppe B. Ausgehend von der Annahme des Zutreffens der Nullhypothese werden die stetigen Daten der Gruppen A und B vereinigt und zu singulär-ordinalen Daten rangtransformiert. Es entsteht somit eine gemeinsame Rangreihe in aufsteigender Folge von Rang 1 bis Rang 2 N. Dann summiert man separat die Ränge der Gruppen A und B und erhält zwei Rangsummen T_A und T_B. Im konkreten Fall der Abbildung 19 errechnet man T_A = 815 und T_B = 361 bei N = 24. Die gesuchte Überschreitungswahrscheinlichkeit p läßt sich anhand von N und dem Kleineren der beiden T-Werte aus statistischen Tabellen (80) ablesen und ergibt für T_B = 361 bei N = 24 den Wert $p<0.001$. Die Nullhypothese wird demnach mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p<0.001$ verworfen und der Unterschied der Gruppen A und B kann als signifikant betrachtet werden.

2.6.4.3 Rangkorrelationstest nach Spearman

Der Rangkorrelationstest nach Spearman (81) prüft den Zusammenhang zweier abhängiger Rangreihen. Im konkreten Beispiel der Tabelle 7 entstehen solche Rangreihen, wenn eine Anzahl N Mikrokulturen hinsichtlich zweier Merkmale (Lyse der Zielzellen I.E.-MEF und S-MEF) getestet werden und die gemessenen stetigen P-Werte (2.6.1.1) zu singulär-ordinalen Daten rangtransformiert werden, indem man ihnen in aufsteigender Folge Rangwerte von 1 bis N zuordnet. Der Korrelationstest stellt die qualitative Frage nach der Identität der Zielzellantigene und nicht die quantitative Frage nach der Lysierbarkeit der Zielzellen, die neben der Existenz des Antigens auch von nicht kontrollierten Parametern wie der Antigendichte oder zelltypautonomen Eigenschaften abhängt.

Der Rangkorrelationskoeffizient von Spearman wird berechnet nach der Formel:

$$R_s = 1-6S^2/N(N^2-1)$$

,wobei S^2 die Summe der Quadrate der Rangdifferenzen bezeichnet. Die Signifikanz der Korrelation kann für N >20 asymptotisch nach der Formel $U = R_s(N - 1)^{0.5}$ geprüft werden, wobei für U die zugehörigen Überschreitungswahrscheinlichkeiten p aus Tabellen der Standard-Normalverteilungsfunktion (82) entnommen werden können. Die Hypothese der unabhängigen Verteilung (Nullhypothese) wird verworfen und entsprechend die Alternativhypothese der Korrelation akzeptiert für positive Werte von R_s und $p < 0.05$ (einseitig).

3. RESULTATE

3.1 Nachweis in vivo sensibilisierter Vorläufer MCMV-spezifischer zytolytischer T-Lymphozyten während der akuten antiviralen Immunantwort

3.1.1 Demonstration zweier Reifungsstadien sensibilisierter CTL-P

Vorläufer zytolytischer T-Lymphozyten (cytolytic T lymphocyte precursors, CTL-P) mit Spezifität für Haptene oder H-2 Alloantigene können in vitro mit Antigen oder Mitogen aktiviert werden. Nur solchermaßen sensibilisierte CTL-P, nicht jedoch ruhende CTL-P, können dann in Gegenwart von T-Zell Wachstumsfaktor Interleukin 2 (IL 2) in vitro auch in Abwesenheit von Antigen proliferieren und somit zu Klonen heranwachsen (83, 84). Die Generierung zytolytischer Aktivität erfordert nach neueren Erkenntnissen nicht nur IL 2 sondern auch die durch einen Differenzierungsfaktor vermittelte Reifung der IL-rezeptiven, proliferierenden IL-CTL-P zu Effektor-CTL (61, 85). Ein zur Expression der IL 2-Sensitivität zusätzlich zu Antigen notwendiges, humorales frühes Differenzierungssignal wird diskutiert (86). Alle diese Wachstums- und Differenzierungsinterleukine sind im Kulturüberstand mitogen-aktivierter T-Lymphozyten enthalten.

Aus noch nicht geklärten Gründen können in Lymphozyten-populationen nicht immunisierter Mäuse nur wenige CTL-P mit Spezifität für H-Y Alloantigen (87), Minor-H Antigene (88) oder virale Antigene, wie Antigene des Herpes Simplex Virus (89) oder des Rabiesvirus (90) in vitro induziert werden. Wie am Modell der letalen Infektion der Maus mit Rabiesvirus gezeigt wurde, werden im Verlauf einer akuten Virusinfektion antivirale CTL-P in vivo aktiviert und können in vitro propagiert werden (90). In diesem System hatte zu einem bestimmten Zeitpunkt der Immunantwort nur eine Minderheit der sensibilisierten CTL-P bereits in vivo den Reifungsgrad der IL-CTL-P erreicht und ließ sich somit in vitro allein in Anwesenheit von Interleukin zu

Klonen von Effektor-CTL expandieren, wohingegen die Mehrheit nochmals in vitro mit Antigen restimuliert werden mußte. Der Erwerb der IL-Sensitivität diente somit als ein funktioneller Marker für in vivo Aktivierung. Da eine in vitro Reaktivierung die in vivo vorhandenen Unterschiede im Differenzierungsgrad antigenaktivierter CTL-P nivelliert und zudem die Art wie auch die Dosis des in vitro applizierten Antigens für bestimmte Klonotypen selektieren könnte, diskutierten die Autoren die IL-CTL-P als die besten Repräsentanten des unverfälschten in vivo exprimierten Spektrums antiviraler Lymphozyten der CTL-Differenzierungslinie.

Trotz der grundlegend unterschiedlichen Pathogenese der MCMV Infektion - Etablierung von Latenz anstelle von Letalität - konnten diese Befunde durch Anwendung eines analogen Limiting Dilution Protokolls (Abbildung 1) im MCMV-System bestätigt werden und sind somit offenbar nicht charakteristisch für die letale Infektion, sondern vielmehr von allgemeiner Bedeutung für den Verlauf der in vivo Aktivierung und Reifung antiviraler CTL-P. In Abbildung 2 sind exemplarisch zwei konzeptionell gleiche Experimente einander gegenübergestellt, um die Varianz der Frequenzschätzungen zu demonstrieren. Trotz der numerischen Unterschiede zwischen unabhängigen Experimenten wurde die grundlegende Beobachtung der Existenz zweier signifikant unterschiedlicher Frequenzen reproduziert, und sogar das Verhältnis zwischen antigenabhängigen CTL-P und antigenunabhängigen IL-CTL-P erwies sich als annähernd konstant.

Wie die in Tabelle 1A dargestellte Kinetik ausweist, treten IL-CTL-P in drainierenden Lymphknoten nur transient auf und markieren so die akute Phase der lokalen antiviralen Immunantwort. Da die nach Restimulation gemessenen Frequenzen die IL-CTL-P Frequenzen mit erfassen, lassen sich antigenabhängige CTL-P und damit eine Disparität der nach beiden Protokollen gemessenen Frequenzen erst an Tag 8

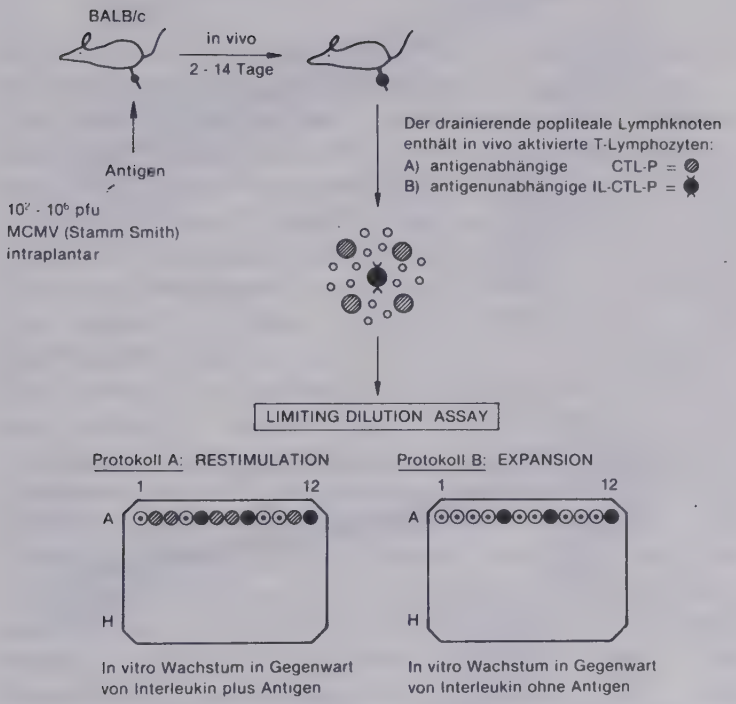


Abbildung 1 Experimentelles Schema zur quantitativen Analyse in vivo aktivierter Lymphozytenpopulationen

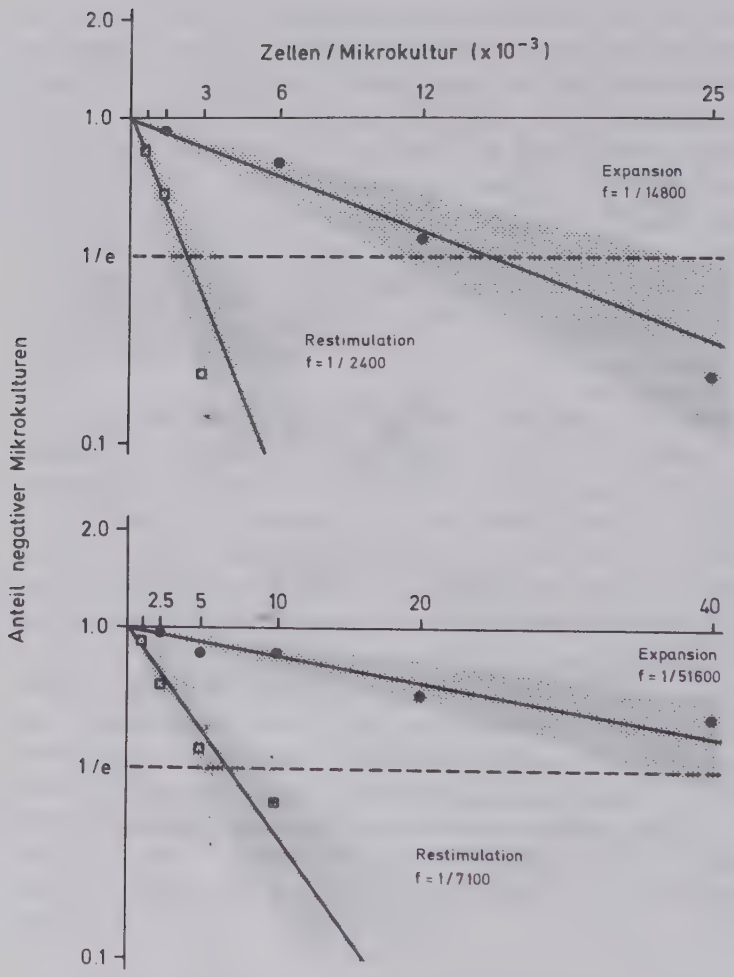


Abbildung 2 Auf dem Höhepunkt der akuten Immunantwort nach intraplantarer MCMV Infektion lassen sich im drainierenden poplitealen Lymphknoten zwei Reifungsstadien sensibilisierter Vorläufer MCMV-spezifischer CTL unterscheiden.

Legende zu Abbildung 2

Auf dem Höhepunkt der akuten Immunantwort nach intraplantarer MCMV Infektion lassen sich im drainierenden poplitealen Lymphknoten zwei Reifungsstadien sensibilisierter Vorläufer MCMV-spezifischer CTL unterscheiden.

Acht Tage nach intraplantarer Infektion von Balb/c Mäusen mit 10^4 pfu MCMV wurde in der aktivierten Lymphozytenpopulation ipsilateraler poplitealer Lymphknoten das Auftreten antigenunabhängiger IL-CTL-P und gleichfalls sensibilisierter, aber noch antigenabhängiger CTL-P durch entsprechende, konzeptionell unterschiedliche Modifikationen des Limiting Dilution (LD) Assays quantifiziert (2.4.3.2). Im Restimulations-LD Assay wurden die Lymphozyten in Gegenwart von 20% v/v Interleukin plus Antigen in Form von 10^4 MCMV-infizierten MEF Stimulatorzellen (2.5.4.2) für die Dauer von sechs Tagen in vitro kultiviert und damit sowohl antigenspezifisch reaktiviert als auch vermehrt. Dagegen wurden im Expansions-LD Assay interleukinrezeptive Lymphozyten in Gegenwart von 20% v/v Interleukin plus 10^4 nichtinfizierten MEF Fillerzellen in vitro vermehrt, aber nicht antigenspezifisch reaktiviert. Die beobachtete Relation der CTL-Vorläufer Frequenzen wird vom statistischen Fehler bei der Bestimmung der Zellzahl nicht beeinträchtigt, da auf replikaten Mikrotiterplatten für die serielle Titration dieselbe Zellsuspension eingesetzt wurde. Zur Demonstration der numerischen Varianz bei den Frequenzbestimmungen sind zwei unabhängige Experimente dargestellt. Die schattierten Sektoren veranschaulichen die 95 % Vertrauensgrenzen der Minimum Chi-Quadrat Schätzungen (2.6.2.2).

Tabelle 1A Kinetik der CTL-Vorläufer Frequenzen nach intraplantarer Infektion[a)]

Tage p.i.	CTL-Vorläufer Frequenz in ipsilateralen poplitealen Lymphknoten					
	Expansion			Restimulation[b)]		
0	< $1/10^5$			< $1/10^5$		
4	1/17000; 59(43-74)[c)];	pMC 0.587		1/20600;	48(33-64);	pMC 0.346
8	1/23200; 43(31-56);	pMC 0.486		1/ 7900;	126(74-179);	pMC 0.170
14	< $1/10^5$			1/23100;	43(29-58);	pMC 0.145

a) Acht Wochen alte Balb/c Mäuse wurden nach 2.4.2 mit 10^5 pfu MCMV infiziert. Die relative Häufigkeit aktivierter MCMV-spezifischer CTL-Vorläufer wurde durch Limiting Dilution Experimente (2.4.3.2) ermittelt. Der CML-Assay (2.4.6.1) wurde mit der Zielzelle MCMV-MEF (2.5.4.2) durchgeführt.

b) 0.2 pfu MCMV/Responderzelle

c) Frequenz (95% Vertrauensgrenzen) pro 10^6 Lymphozyten, berechnet nach dem Minimum Chi-Quadrat Verfahren (2.6.2.2)

Tabelle 1B Transiente IL-CTL-P Aktivität in zervikalen Lymphknoten nach intraplantarer Infektion

Tage p.i.	CTL-Vorläufer Frequenz in zervikalen Lymphknoten	
	Expansion	Restimulation
4[a)]	$< 1/10^5$	$< 1/10^5$
8[b)]	1/66300; 15(10-20); pMC 0.699	1/44100; 23(16-30); pMC 0.704
14	$< 1/10^5$	$< 1/10^5$

a) In 4/4 Versuchstieren war MCMV in den Speicheldrüsen nachweisbar (2.5.3.4).

b) Der Virustiter in den Speicheldrüsen (7/7 Versuchstiere MCMV positiv) betrug 10^3 bis 10^4 zentrifugale pfu.

gesichert feststellen. Reaktivierbare Zellen sind auch nach Abklingen der IL-CTL-P Aktivität noch nachweisbar und sind dann als Memory- CTL anzusprechen. Im kontralateralen poplitealen Lymphknoten wurden keine IL-CTL-P beobachtet (Werte nicht gezeigt), wohingegen am Tag 8 IL-CTL- P in geringer, aber statistisch gesicherter Frequenz in den zervikalen Lymphknoten transient auftraten (Tabelle 1B). Zu diesem Zeitpunkt befand sich bereits Virus in den Speicheldrüsen, also am bevorzugten Ort der persistenten Virusreplikation. Aufgrund dieser Befunde erscheint eine de novo Aktivierung von CTL-P in den zervikalen Lymphknoten wahrscheinlicher als eine Ausbreitung aktiver IL-CTL-P ausgehend von den regionalen Lymphknoten, die den Ort der primären Infektion drainieren.

Der Grad an Aktivierung im drainierenden Lymphknoten erwies sich als abhängig von der Infektionsdosis. Das Inkrement der IL-CTL-P Frequenz war mit f = 1/25300 nach Infektion mit 10^2 pfu bis zu f = 1/4900 nach Infektion mit 10^6 pfu allerdings bemerkenswert gering. Auch im MCMV-System konnten im Restimulationsprotokoll ohne vorherige in vivo Aktivierung keine MCMV-spezifischen CTL in vitro generiert werden (f $<1/10^5$, Tabelle 1 A).

3.1.2 Beide Reifungsstadien sensibilisierter CTL-P befinden sich vorrangig in der Lymphoblastenfraktion des drainierenden Lymphknotens.

Ruhende CTL-P und reife Memory-CTL befinden sich in der Go-Phase des Zellzyklus und sind somit metabolisch weitgehend inaktiv. Sensibilisierung durch Antigen führt zu Blastogenese und bei einer IL-vermittelten Expansion sind naturgemäß Mitosestadien zu erwarten. Wenn IL-CTL-P tatsächlich im Zuge einer MCMV Infektion in vivo entstehen, sollten sie sich auch einer in vivo existenten Lymphoblastenfraktion zuordnen lassen. Eine von Interleukin in Assoziation mit Komponenten des

Abbildung 3A Aktivierte parakortikale Region eines drainierenden poplitealen Lymphknotens

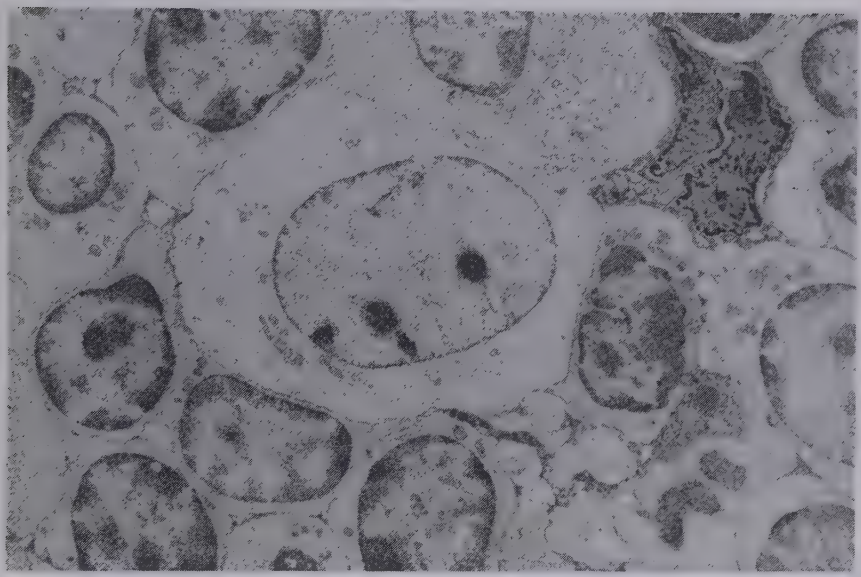


Abbildung 3A-C Elektronenmikroskopische Darstellung der zur funktionellen Analyse eingesetzten Lymphozytenpopulation

Sensibilisierte Lymphozyten aus durch intraplantare MCMV Infektion aktivierten poplitealen Lymphknoten wurden über einen Percoll Dichtestufengradienten in eine Fraktion von Lymphoblasten und eine Fraktion dichter Lymphozyten separiert. Das Lymphknotengewebe sowie die Zellen in Suspension wurden nach Doppelfixierung mit 2.5% Glutaraldehyd und 1% Osmiumtetroxid in Araldit eingebettet. Die von diesem Material angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und bei 3000facher Vergrößerung untersucht.
(Der elektronenmikroskopische Teil der Studie wurde von Dr.F. Weiland und Frl.T.Messerschmid durchgeführt.)

Abbildung 3B Fraktion der Lymphoblasten

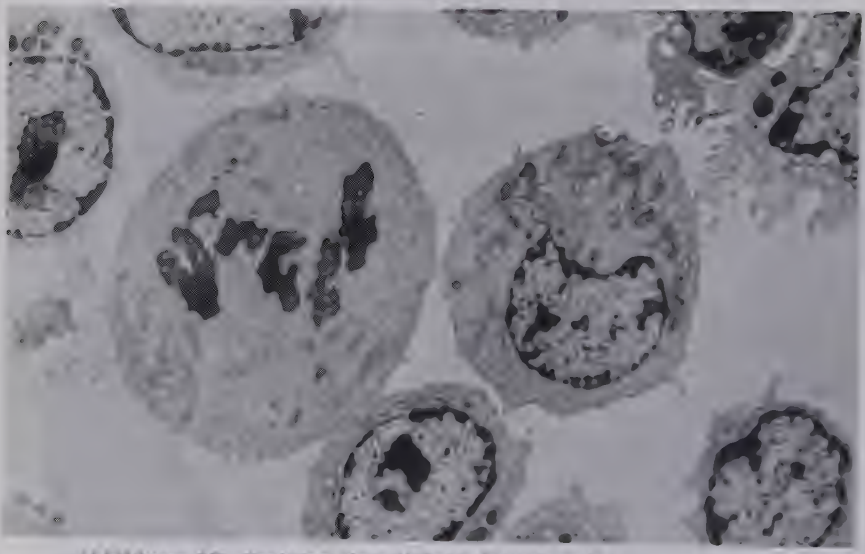
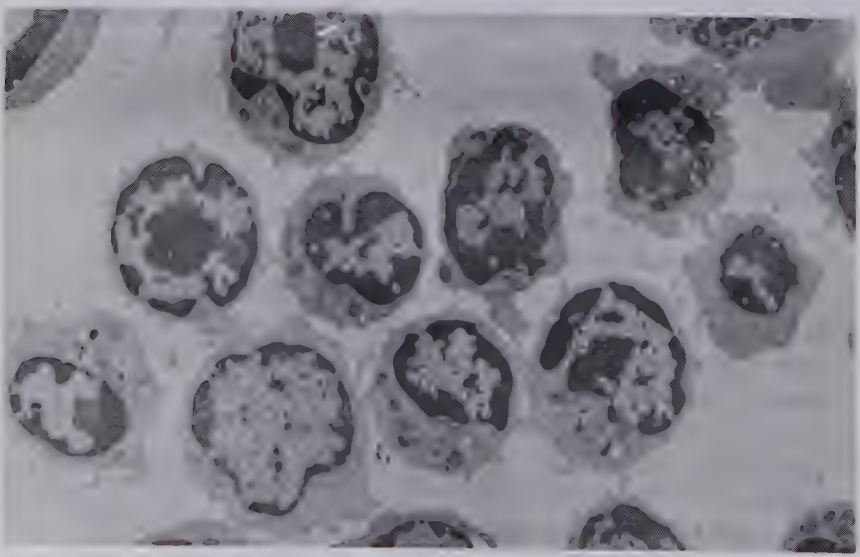


Abbildung 3C Fraktion der dichten Lymphozyten



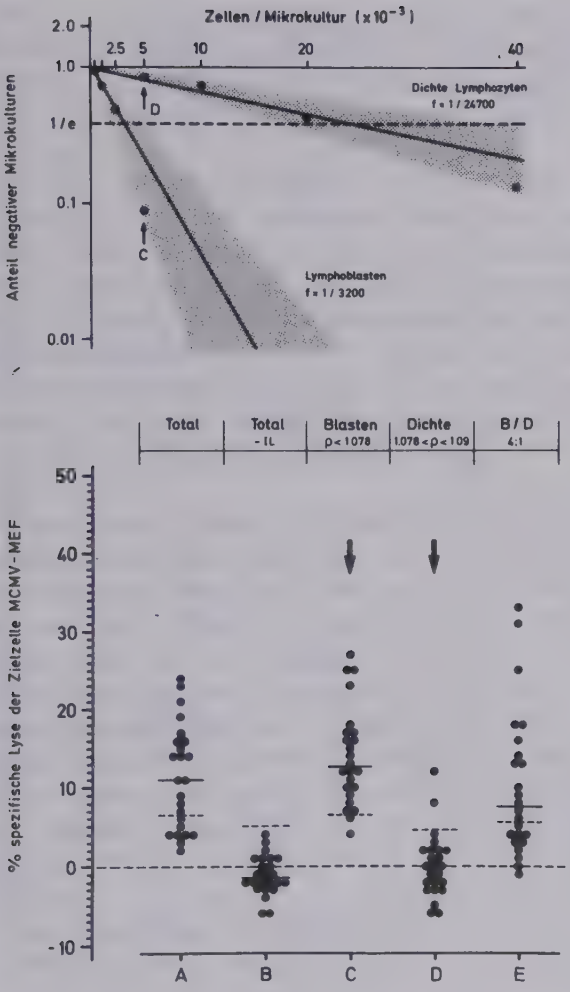


Abbildung 4 A/B Nach intraplantarer Infektion befinden sich aktivierte Vorläufer MCMV-spezifischer CTL vorrangig in der Lymphoblastenfraktion des drainierenden poplitealen Lymphknotens.

Tabelle 2 Nach intraplantarer Infektion befinden sich aktivierte Vorläufer MCMV-spezifischer CTL vorrangig in der Lymphoblastenfraktion des drainierenden poplitealen Lymphknotens.

Fraktion	CTL-Vorläufer Frequenz in Lymphozyten-Dichtefraktionen	
	Expansion	Restimulation[a]
Gesamtpopulation	1/ 3700; 273(192-352)[b]; pMC 0.943	1/1600; 610(408- 811); pMC 0.628
Lymphoblasten	1/ 3200[c]; 316(208-423); pMC 0.257	1/ 660; 1516(1089-1942); pMC 0.502
Dichte Lymphozyten	1/24700[c]; 41(27- 54); pMC 0.671	1/6800; 147(104- 189); pMC 0.973

a) 10^4 MCMV-MEF, 24 Stunden nach zentrifugaler Infektion mit 0.05 pfu MCMV (2.5.4.2)

b) Frequenz (95% Vertrauensgrenzen) pro 10^6 Lymphozyten, berechnet nach dem Minimum Chi-Quadrat Verfahren (2.6.2.2)

c) Daten aus Abbildung 4

Legende zu Tabelle 2 und Abbildung 4A/B

Nach intraplantarer Infektion befinden sich aktivierte Vorläufer MCMV-spezifischer CTL vorrangig in der Lymphoblastenfraktion des drainierenden poplitealen Lymphknotens.

Acht Tage nach intraplantarer Infektion mit 10^5 pfu MCMV wurden aus den ipsilateralen poplitealen Lymphknoten von 20 Versuchstieren im Durchschnitt 1.35×10^7 sensibilisierte Lymphozyten pro Lymphknoten gewonnen. Die physikalische Trennung über einen Percoll Dichtestufengradienten nach der Sedimentations-Flotationsmethode (2.4.4) lieferte eine Ausbeute von 78.3% Lymphoblasten (rho <1.078 g/cm^3) und 21.7% dichten Lymphozyten (1.078< rho <1.090). Die wenigen Zellen in der Interphase (rho = 1.078) wurden verworfen.

Die Häufigkeitsverteilung aktiver und stimulierbarer Lymphozyten in den verschiedenen Fraktionen wurde durch Limiting Dilution Experimente ermittelt (Tabelle 2, Abb.4A). Die schattierten Sektoren in der Abbildung veranschaulichen die 95% Vertrauensbereiche der Schätzungen (2.6.2.2). Die in individuellen Mikrokulturen durch Expansion von 5×10^3 Lymphozyten generierten lytischen Aktivitäten sind in Abbildung 4B dargestellt für die unseparierte Population mit und ohne Interleukin (Vergleich der Spuren A und B), die separierten Fraktionen (Spuren C und D) sowie für die rekonstituierte Population (Spur E).

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse (n = 24; 2.6.2.1)

——— Medianwert der spezifischen Lyse (N = 24; 2.6.1.3)

Kultursystems vermittelte in vitro Aktivierung, wie sie für hapten-spezifische selbstrestringierte CTL-P beschrieben wurde (91), könnte dann für das MCMV-System verneint werden.

Abbildung 3A zeigt Lymphoblasten in der thymusabhängigen, parakortikalen Region eines aktivierten, drainierenden poplitealen Lymphknotens nach intraplantarer MCMV Infektion. Eine Trennung der Lymphozyten nach Dichte führte zu einer Anreicherung mitotisch aktiver Lymphoblasten in der Fraktion geringerer Dichte (vergleiche Abbildungen 3B und 3C). Der Beweis für eine Zuordnung der funktionell definierten IL-CTL-P zur Lymphoblastenfraktion wurde durch Frequenzbestimmung vermittels Expansion-Limiting Dilution Assay erbracht (Abbildung 4A/B). Der Vergleich der Spuren A und B in Abbildung 4B zeigt die Abhängigkeit der Expansion von Interleukin.

Wie die in Tabelle 1A wiedergegebene Kinetik ausweist, werden die antigenabhängigen Zellen nicht quantitativ in IL-CTL-P überführt und sind somit vermutlich nicht deren Vorläufer. Es liegt nahe zu diskutieren, ob diese Zellen als frühe Memory-CTL aufzufassen sind, zumal funktionell nicht unterscheidbare Zellen auch nach Abklingen der IL-CTL-P Immunantwort im drainierenden Lymphknoten persistieren. Die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse enthalten die für diese Diskussion wichtige Information, daß die antigenabhängigen Zellen ebenfalls vorrangig der Lymphoblastenfraktion angehören und sich damit im Gegensatz zu den späten Memory-CTL in einer aktiven Phase des Zellzyklus befinden.

3.1.3 Die Expansion von IL-CTL-P beruht nicht auf Restimulation durch residuales Antigen.

Auch wenn im Expansionsprotokoll Antigen nicht extern in vitro appliziert wird, so könnte dennoch bereits im Lymphknoten befindliches Antigen eine in vitro Restimulation der sensibilisierten CTL-P bewirken. Durch Kokultivation von

Tabelle 3 Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten akut intraplantar infizierter Mäuse sind nicht in der Lage Memory-CTL zu reaktivieren[a].

Restimulationsbedingungen		Memory-CTL Frequenz
Virus[b]	Stimulatorzellen	in ipsilateralen poplitealen Lymphknoten
+	-	1/15200; 66(45-86)/10^6; pMC 0.245
-	-	< 1/10^5
+	10^5 immune Ly-Mit C	1/20100; 50(31-69)/10^6; pMC 0.139
-	10^5 immune Ly-Mit C	< 1/10^5

a) Acht Tage nach Infektion (2.4.2) mit 10^5 pfu MCMV wurden sensibilisierte Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten mit Mitomycin C behandelt (2.4.3.3) und in Limiting Dilution Mikrokulturen (2.4.3.2) als Stimulatorzellen eingesetzt. Als Responderzellen dienten Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten drei Wochen nach intraplantarer Infektion.

b) 0.1 pfu MCMV/Responderzelle

Lymphozyten mit MEF Indikatorzellen konnten im drainierenden Lymphknoten MCMV-infizierte Zellen nachgewiesen werden, allerdings nur in der sehr niedrigen Frequenz von $1/10^6$ Lymphozyten. Zumindest in Limiting Dilution Experimenten stören diese Zellen nicht, da sie vor den zu testenden IL-CTL- P austitriert werden. Die Beobachtung einer Single Hit Kinetik (Abbildung 2) unterstützt diese Argumentation. Eine saturierende Präsentation von nichtinfektiösen viralen Komponenten oder von prozessiertem Antigen ist damit jedoch noch keineswegs ausgeschlossen. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob inaktivierte Zellen, die aus einem drainierenden Lymphknoten nach intraplantarer Infektion stammen, die Fähigkeit besitzen, Memory-CTL zu restimulieren. Wie die in Tabelle 3 gezeigten Daten ausweisen, besitzen solche Lymphozyten keine Stimulatoreigenschaften. Sie konnten weder Memory-CTL reaktivieren noch die Frequenz der durch infektiöses Virus abrufbaren Memory-CTL erhöhen. Die Unabhängigkeit von einer Stimulation durch Antigen ist somit eine zellautonome Eigenschaft der IL-CTL-P und wird nicht durch residuales Antigen simuliert.

3.1.4 Interleukin vermittelt eine homogene, klonale in vitro Expansion der in vivo sensibilisierten IL-CTL-P.

Beim Anlegen von Expansionsmikrokulturen werden IL-CTL-P naturgesetzlich entsprechend der Poisson-Statistik auf die individuellen Kulturen verteilt. Der Verteilungsparameter Lambda hängt ab von der eingesetzten Zellzahl sowie von der zu bestimmenden relativen Häufigkeit der MCMV-spezifischen und auch expansionsfähigen IL-CTL-P in der Lymphozytengesamtpopulation.

Die in der Einzelkultur nach Ablauf der in vitro Expansionsphase generierte und im CML-Assay meßbare lytische Aktivität der Nachkommen-CTL ist einerseits abhängig von der Anzahl an enthaltenen Klonen, festgelegt durch die initiale Anzahl an Vorläuferzellen, andererseits wird sie aber auch bestimmt durch

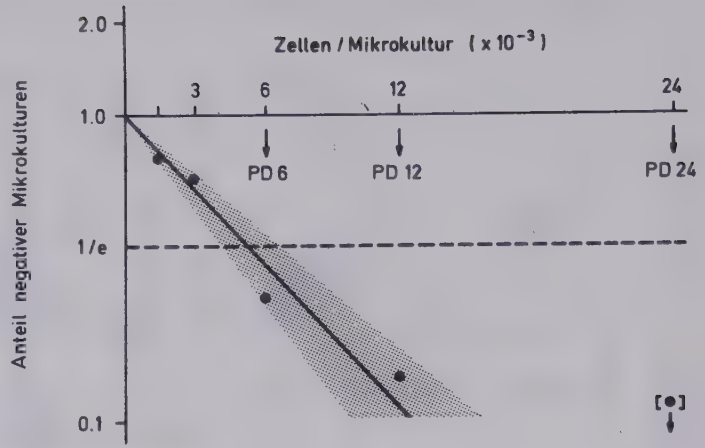
die lytische Leistung der Klone. Diese wiederum hängt ab von der Klongröße, also vom Ausmaß der Expansion, und von der Avidität der CTL zu den Antigenen der Zielzelle. Nur dann, wenn die Vorläuferzellen homogen zu Klonen vergleichbarer Leistung expandiert werden und nur die unterschiedliche Belegung der individuellen Kulturen für die Unterschiede der Kultureffektorleistungen verantwortlich ist, kann die Vorläuferfrequenz über den Verteilungsparameter Lambda aus der empirischen Verteilung der lytischen Einzelaktivitäten ermittelt werden. Bei in vitro Aktivierung oder Restimulation durch Antigen betrachtet man diese Bedingung in der Regel als nicht erfüllt, weshalb CTL-P Frequenzen üblicherweise nach der Limiting Dilution Methode bestimmt werden (71-75). Es sollte nun geprüft werden, ob im Fall der Expansion von IL-CTL-P, also bei Anwendung eines in vitro Protokolls, bei dem auf Restimulation durch Antigen verzichtet wird, die Voraussetzung für eine Frequenzbestimmung aus der Verteilung der Effektorleistungen gegeben ist. Die theoretischen Grundlagen für den mathematisch-statistischen Ansatz werden in den Abschnitten 2.6.2 und 2.6.3 erläutert. In einem exemplarischen Experiment wurde die IL-CTL-P Frequenz zunächst in konventioneller Weise durch Limiting Dilution Assay anhand der Titration der Nullfraktionen ermittelt, wobei auf jeder Titrationsstufe 72 replikate Expansionsmikrokulturen in positive und negative Kulturen kategorisiert wurden (Abbildung 5, Tabelle 4). Da für jede Kultur eine lytische Aktivität gemessen wurde, ist ein solches Verfahren mit einem erheblichen Verlust an Information verbunden. Zur Frequenzbestimmung durch eine Verteilungsanalyse wurde für einen Punkt der Geraden (PD12) die zugehörige stetige Verteilung der lytischen Einzelaktivitäten durch Definition von Klassen mit einer zu variierenden Klassengröße in drei verschiedene diskrete Häufigkeitsverteilungen derselben Eingangsinformation transformiert (Abbildung 6A-C). Die Klassengröße hat dabei die biologische Bedeutung einer durchschnittlichen klonalen Leistung (average clone effect, ACE) unter Annahme einer symmetrischen Verteilung der

wahren, aber nicht bekannten klonalen Leistungen. Wie Tabelle 5 ausweist, ist von den drei dargestellten Möglichkeiten nur die empirische Verteilung der Abbildung 6B konform mit einer Poissonverteilung. Mit Hilfe eines Computerprogrammes kann die Klassengröße stufenweise variiert und so das Poisson-Wahrscheinlichkeitsspektrum der zu untersuchenden empirischen Verteilung aufgenommen werden (Poisson Distribution Scanning Methode). Für die Poissonverteilung PD12 ermittelt man so einen Akzeptanz-Bereich für den Verteilungsparameter Lambda und damit den Range für die Schätzung der IL-CTL-P Frequenz (Abbildung 7, Tabelle 6). Im Gegensatz zum Limiting Dilution Verfahren ist die Verteilungsanalyse voraussetzungsfrei hinsichtlich einer Nachweisgrenze zur Detektion positiver Kulturen. Ungeachtet des grundlegend unterschiedlichen Ansatzes führten beide Methoden im Rahmen der jeweiligen Varianz zum gleichen Ergebnis. Die Frequenzschätzung wurde zudem bestätigt durch die Poissonverteilungen PD6 und PD24 (Abbildung 7, Tabelle 6). Da auf der Titrationsstufe PD24 alle Kulturen als positiv beurteilt wurden, ist dieser Punkt für eine Limiting Dilution Auswertung wertlos. Die zugehörige Verteilung enthält jedoch, wie die Verteilungsanalyse beweist, die vollständige Information und erlaubt eine Frequenzschätzung, die sich vollkommen mit der Schätzung aus dem Limiting Dilution Assay deckt.

Die Beobachtung, daß die unbekannte Verteilung der klonalen Leistungen durch die Schätzung einer durchschnittlichen klonalen Leistung substituiert werden kann, ist ein Hinweis für eine relativ homogene Vermehrung der IL-CTL-P unter den Bedingungen des Expansionsprotokolls.

Abbildung 5
Tabelle 4

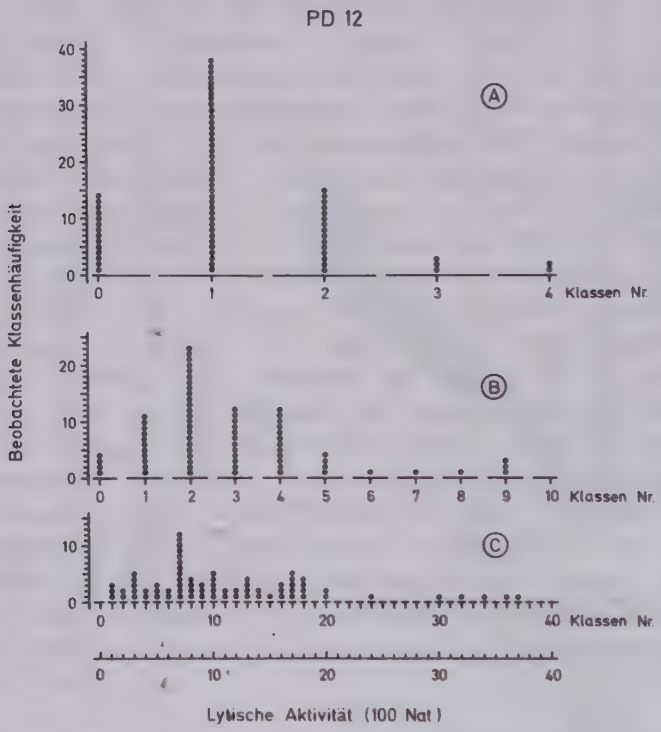
Bestimmung der IL-CTL-P Frequenz durch Limiting Dilution Analyse[a)]



Statistisches Rechenverfahren	IL-CTL-P Frequenz (95% CL)	FG;Chi^2;Wahrscheinlichkeit
Maximum Likelihood	1/5357 (1/4524-1/6344)	3; 3.18; p = 0.364
Minimum Chi-Quadrat	1/5405 (1/4645-1/6462)	3; 3.17; p = 0.366

a) Infektion von Balb/c mit 10^6 pfu MCMV intraplantar; 8 Tage popliteale Lymphknoten

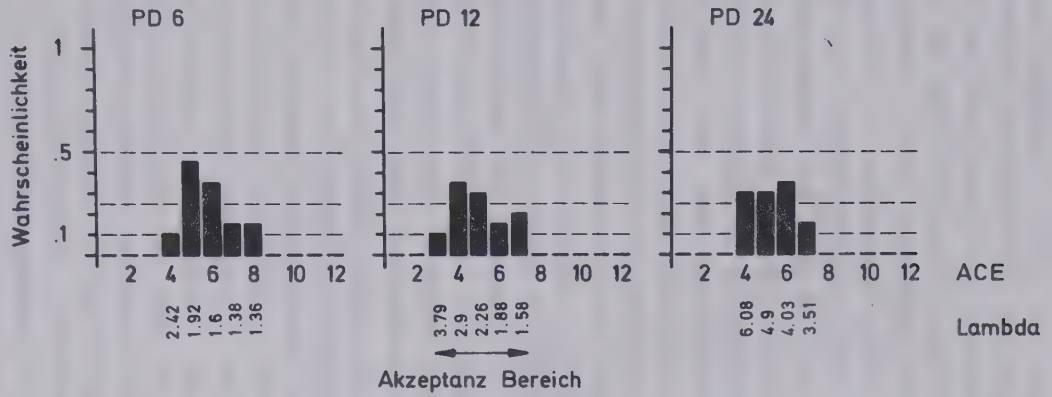
Abbildung 6 Verteilungsanalyse der lytischen
Tabelle 5 Einzelaktivitäten



Empirische Verteilung	A	B	C
Durchschnittliche klonale Leistung	10	4	1
Poisson Parameter Lambda	1.18	2.90	11.51
Relative IL-CTL-P Frequenz	1/10165	1/4134	1/1043
Wahrscheinlichkeit p	.02<.05	.32>.05	0<.05
Hypothese der Poissonverteilung	verworfen	akzeptiert	verworfen

Abbildung 7 Bestimmung der IL-CTL-P Frequenz durch Poisson Distribution Scanning

Tabelle 6



Poisson Verteilung	PD 6	PD 12	PD 24
Lambda Optimum (Akzeptanz-Bereich)	1.92(2.42-1.36)	2.90(3.79-1.58)	4.03 (6.08-3.51)
IL-CTL-P Frequenz	1/3130	1/4134	1/5958
Range	1/2483-1/4747	1/3165-1/7579	1/3945-1/6830
Anzahl Freiheitsgrade; Wahrscheinlichkeit	5; 0.426	4; 0.320	6; 0.324

3.1.5 Die Generierung zytolytischer Aktivität im Expansionsprotokoll ist abhängig von der Interleukindosis.

Entsprechend der Definition der IL-CTL-P erfordert deren Vermehrung die Anwesenheit von Interleukin und demzufolge wird der Grad an Expansion und damit auch die in Expansionsmikrokulturen generierte lytische Aktivität von der Interleukindosis determiniert (Abbildung 8A/B). Vermutlich infolge interner Interleukinproduktion entstehen MCMV-spezifische CTL bei hoher Responderzellzahl auch ohne Zugabe von Interleukin. Diese Aktivität kann bereits durch Zugabe geringer Interleukinmengen erheblich verstärkt werden, während selbst bei hohen Interleukinkonzentrationen keine CTL aktiviert werden, die nichtinfizierte MEF oder Balb 3T3 Fibroblasten lysieren können. In diesem Sinne ist die Expansion also spezifisch. Allerdings begünstigt eine hohe Interleukindosis die Generierung von CTL mit lytischer Aktivität gegen Zellen, die mit Rabiesvirus, Stamm ERA, infiziert wurden, obwohl das Herpesvirus MCMV sicherlich keine antigenen Gemeinsamkeiten mit dem Rhabdovirus ERA hat. Tatsächlich sind diese CTL auch nicht identisch mit denjenigen CTL, die MCMV-infizierte Zellen lysieren, da die lytischen Aktivitäten gegen diese beiden Zielzellen nicht miteinander korreliert sind (Daten nicht gezeigt). Lytische Aktivität gegen die Mastozytomzelle P815 wurde in Gegenwart hoher Interleukinmengen auch ohne in vivo Sensibilisierung, also aus ruhenden CTL-P generiert (Daten nicht gezeigt), und ähnliche unspezifische NK-artige Effekte wurden in einer Analyse Minor-H spezifischer CTL beschrieben (88). Wie diese Befunde verdeutlichen, selektiert das Expansionsprotokoll nicht für Klone mit Spezifität für MCMV, sondern erlaubt auch die Vermehrung interleukin-rezeptiver Vorläuferzellen anderer Spezifität. Die Bestimmung des Anteils an Vorläuferzellen einer bestimmten Spezifität erfordert die Verwendung einer Zielzelle, die definierte Antigene trägt.

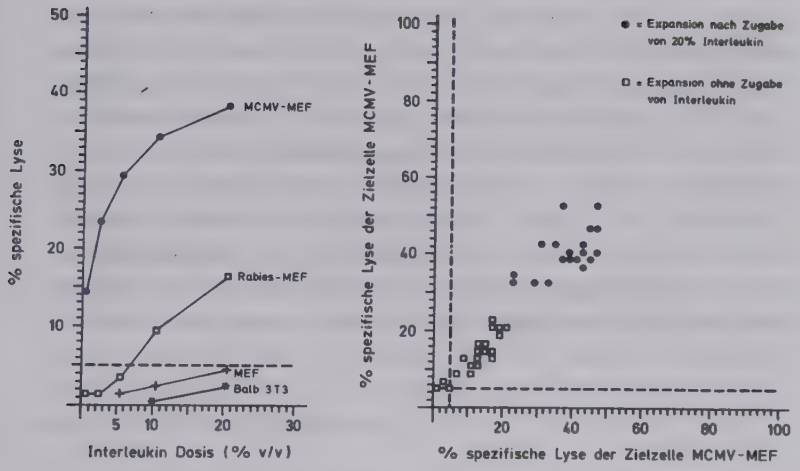


Abbildung 8 A/B Die Generierung zytolytischer Aktivität im Expansionsprotokoll ist abhängig von der Interleukindosis.

Legende zu Abbildung 8A/B — Die Generierung zytolytischer Aktivität im Expansionsprotokoll ist abhängig von der Interleukindosis.

Aktivierte Lymphozyten (10^5 pfu MCMV intraplantar, popliteale Lymphknoten 6 Tage p.i.) wurden sechs Tage in vitro bei einer Zelldichte von 10^5 Zellen pro Mikrokultur (0.25 ml) in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Interleukin vermehrt. Die oligoklonale CTL-Population jeder individuellen Mikrokultur (N = 20) wurde in fünf Aliquots (0.04 ml) geteilt und zweimal gegen die syngene infizierte Zielzelle Balb/c MCMV-MEF getestet (Abb. 8B) sowie zur Spezifitätskontrolle gegen nichtinfizierte Balb/c MEF, Balb 3T3 Fibroblasten und gegen Balb/c MEF, die mit dem Rhabdovirus Rabies, Stamm ERA, infiziert worden waren. Abbildung 8A zeigt die Medianwerte der lytischen Einzelaktivitäten (2.6.1.3) als Funktion der Interleukindosis. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die durch das 99% Toleranzlimit der MCMV-MEF Spontanlyse definierte Nachweisgrenze (2.6.2.1).

3.1.6 Funktionelle und serologische Charakterisierung der IL-CTL-P

In der initialen Phase der Immunantwort nach MCMV-Infektion treten aktivierte NK-Zellen auf (49). Auch Thy 1^+ NK-Zellen proliferieren in Anwesenheit von Interleukin (92). Per Definition sind NK-Zellen nicht selbstrestringiert, und folglich erlaubt der Test auf Selbstrestriktion eine Unterscheidung zwischen aktivierten NK-Zellen und IL-CTL-P (Abbildung 9). Der Test wurde nach vice versa Modus durchgeführt, um zu prüfen, ob in jedem der beiden Responderstämme die infizierte syngene Zielzelle präferentiell lysiert wird. Verglichen mit dem Stamm Balb/c war die Immunantwort gegen MCMV im Stamm C57BL/6 gering, und es war auch lytische Aktivität gegen die nichtinfizierte allogene Zielzelle nachweisbar. Im Stamm Balb/c war die Präferenz für die infizierte syngene Zielzelle offensichtlich, aber auch im Stamm C57BL/6 war die Zahl der positiven Kulturen mit 19 von 24 Kulturen bei Messung auf der infizierten syngenen Zielzelle signifikant höher als bei Messung auf der infizierten allogenen Zielzelle mit nur 8 von 24 Kulturen ($p = 0.0016$, Fisher-Yates exakter Wahrscheinlichkeitstest).

Die T-Lymphozyten Differenzierungsantigene (Lyt Alloantigene) dienen als zusätzliches Kriterium zur Unterscheidung zwischen selbstrestringierten T-Zellen und NK-Zellen (93). Wie aus Abbildung 10 gefolgert werden kann, exprimiert die Mehrheit der IL-CTL-P vor der in vitro Expansion den Thy 1^+, Lyt 1^+, 2^+ Phänotyp. Die Lyt 1.2 depletierte Population konnte durch Zugabe derselben Anzahl Lyt 2.2 depletierter Zellen nicht funktionell rekonstituiert werden (Vergleich der Spuren C-E), was darauf hinweist, daß der Rückgang an Aktivität auf Depletion von Lyt 1^+, 2^+ IL-CTL-P beruht und nicht etwa zurückzuführen ist auf eine Elimination von Lyt 1^+, 2^- T-Helferzellen. Der Erwerb der IL-Rezeptivität während der Aktivierung der CTL-P ist also nicht verbunden mit einem Verlust des Lyt 1 Differenzierungsantigens. Im Gegensatz zu den

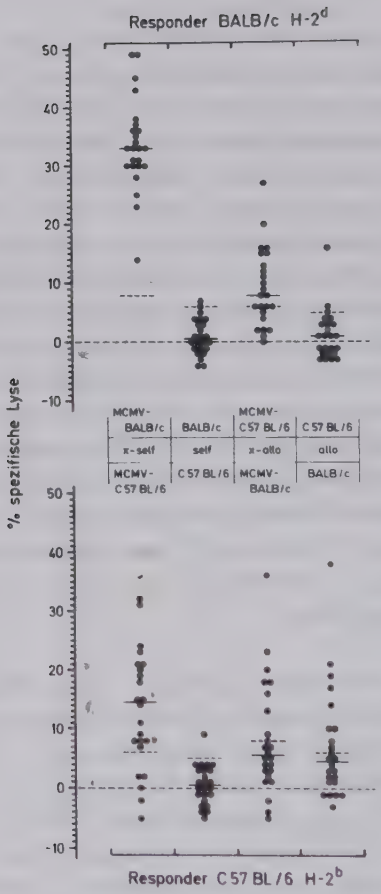


Abbildung 9 Die Nachkommenschaft der IL-CTL-P besteht aus selbstrestringierten CTL.

Legende zu Abbildung 9 **Die Nachkommenschaft der IL-CTL-P besteht aus selbstrestringierten CTL.**

Mäuse der Stämme Balb/c (Haplotyp H-2^d) und C57BL/6 (Haplotyp H-2^b) wurden mit 10^5 pfu MCMV intraplantar infiziert, und am Tag 6 der akuten Immunantwort wurden pro Responderstamm 24 replikate Kulturen mit je 10^5 aktivierten Lymphozyten aus den ipsilateralen poplitealen Lymphknoten unter Expansionsbedingungen angelegt (2.4.3). Nach einer sechstägigen Vermehrungsphase in vitro wurde die zytolytische Nachkommenschaft der IL-CTL-P in vier Aliquots geteilt und auf den in der Abbildung angegebenen vier Arten von Zielzellen nach vice versa Modus ausgetestet.

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse (n = 24; 2.6.2.1)

——— Medianwert der spezifischen Lyse (N = 24; 2.6.1.3)

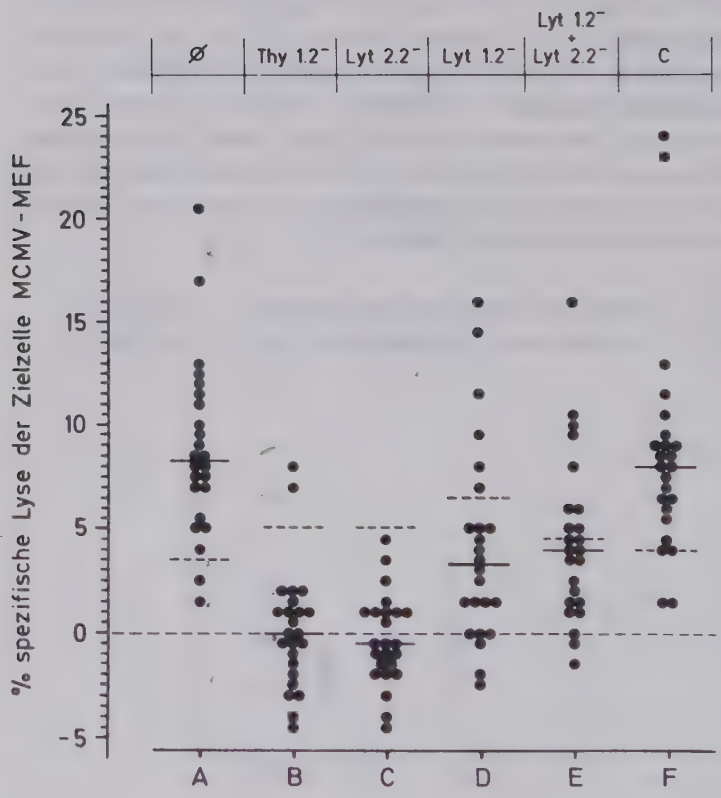


Abbildung 10 Die Mehrheit der IL-CTL-P exprimiert die T-Zell Differenzierungsantigene Lyt-1.2 und Lyt-2.2

Legende zu Abbildung 10 **Die Mehrheit der IL-CTL-P exprimiert die T-Zell Differenzierungsantigene Lyt 1.2 und Lyt 2.2**

In vivo sensibilisierte Lymphozyten (10^4 pfu MCMV intraplantar, popliteale Lymphknoten Tag 6 p.i.) wurden vor der in vitro Expansionsphase mit Antikörper plus Complement behandelt (2.4.5.2). Die Anwesenheit von IL-CTL-P in den depletierten Populationen wurde dann unter Expansionsbedingungen im Limiting Dilution Assay getestet (2.4.3.2). Die Daten für die individuellen Kulturen sind für die Ausgangsmenge von 40 x 10^3 Lymphozyten pro Mikrokultur gezeigt (Spur A: nicht vorbehandelt, Spur B: HO-13-4 anti-Thy-1.2 +C, Spur C: 19-178 anti-Lyt-2.2 +C, Spur D: C3PO anti-Lyt-1.2 +C, Spur E: Mischung bestehend aus 40 x 10^3 Zellen der Gruppe C plus 40 x 10^3 Zellen der Gruppe D, Spur F: Complement). Die in der Complementkontrolle gemessene IL-CTL-P Frequenz betrug 1/36800; 27(20-35)/10^6; pMC 0.463 und in der Lyt-1.2 depletierten Population 1/158700; 6(3-9)/10^6; pMC 0.472.

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse

——— Medianwert der spezifischen Lyse

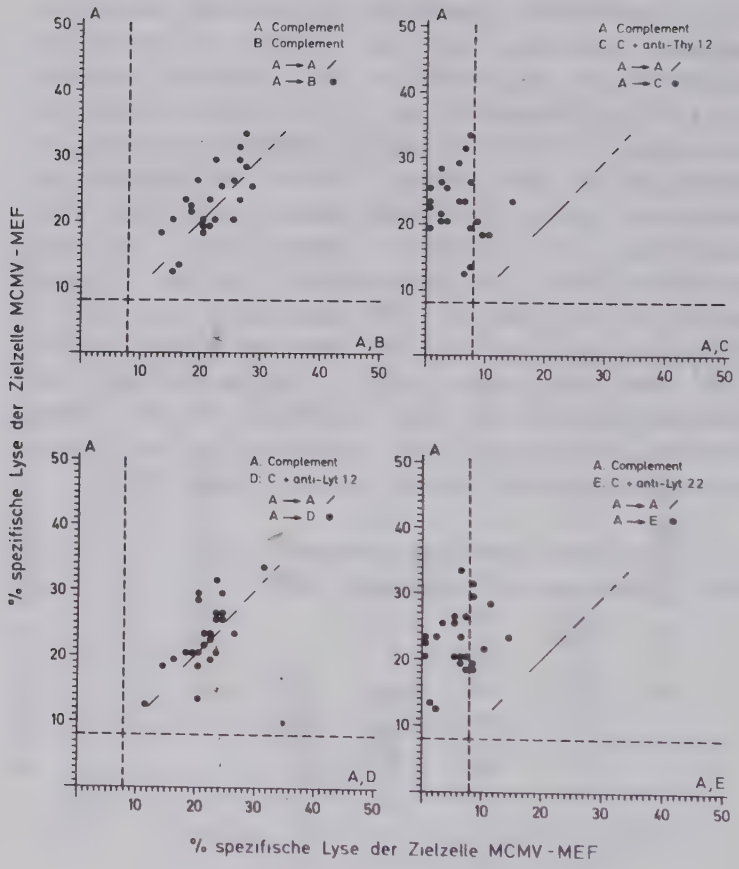


Abbildung 11 Die von IL-CTL-P abstammenden Effektor-CTL zeigen den Lyt 1^-, 2^+ Phänotyp.

Legende zu Abbildung 11 Die von IL-CTL-P abstammenden Effektor-CTL zeigen den Lyt 1^-, 2^+ Phänotyp.

Oligoklonale Expansionskulturen (10^5 pfu MCMV intraplantar, popliteale Lymphknoten Tag 6 p.i., 6 Tage in vitro Vermehrung von 10^5 Lymphozyten/Mikrokultur) wurden in fünf Aliquots geteilt (0.04 ml), und die Effektorzellen wurden entsprechend 2.4.5.3 vor dem CML Test mit Antikörper plus Complement behandelt (Gruppe C: HO-13-4 anti-Thy-1.2 +C, Gruppe D: C3PO anti-Lyt-1.2 +C, Gruppe E: 19-178 anti-Lyt-2.2 +C). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das 99% Toleranzlimit der Spontanlyse (2.6.2.1). Der Vergleich A→A / markiert die theoretische Korrelationsgerade, wohingegen der Vergleich A→B • die in der experimentellen Korrelationskontrolle tatsächlich beobachtete Varianz demonstriert.

IL-CTL-P haben die aus ihnen durch in vitro Expansion abgeleiteten Effektor-CTL den Lyt 1 Marker weitgehend verloren und exprimieren somit den Thy 1^+, Lyt 1^-, 2^+ Phänotyp (Abbildung 11).

Aufgrund dieser funktionellen und serologischen Befunde sind IL-CTL-P und ihre Nachkommen eindeutig der Differenzierungslinie der H-2 restringierten, virusspezifischen zytolytischen T-Lymphozyten zuzuordnen.

3.2 Nachweis replikationsstadien-spezifischer Antigene durch zytolytische T-Lymphozyten

3.2.1 Voraussetzungen für die Nachweisbarkeit neu synthetisierter Antigene auf infizierten Zielzellen

Virale Antigene, soweit sie Strukturkomponenten der Virushülle sind, könnten bereits in der initialen Phase der Infektion einer Zielzelle durch Fusion in die Zellmembran integriert werden. Will man Antigene definieren, die im Verlauf des viralen Replikationszyklus in der infizierten Zelle neu synthetisiert werden und nicht notwendigerweise auch Strukturproteine des Virions sind, so ist es unerläßlich, den eventuellen Beitrag der durch Fusion integrierten Antigene zur Entstehung von Zielzellen zu bestimmen. Wie Abbildung 12 zeigt, steigt die Lyse gegen Zielzellen, die mit UV-inaktivierten Virionen scheininfiziert wurden mit zunehmender Dosis kontinuierlich an. Wurden hingegen die Zellen mit aktivem Virus infiziert unter Bedingungen, die auch die Neusynthese der viralen Strukturproteine erlauben, so führt die Expression der Antigene zu einer effektiveren Lyse mit einem Optimum bei einer relativ geringen Infektionsdosis. Aus nicht näher untersuchten Gründen nimmt die Suszeptibilität der Zielzellen bei höherer Infektionsdosis wieder ab bis schließlich eine gesicherte Unterscheidung zwischen neu synthetisierten Antigenen und durch Fusion integrierten Antigenen nicht mehr möglich ist. Da

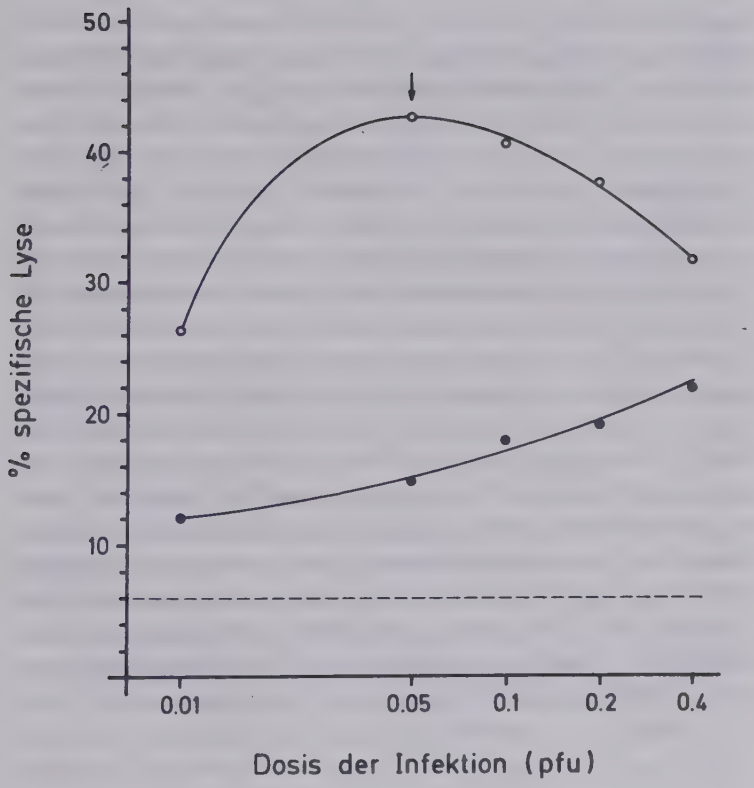


Abbildung 12 Die Entstehung spezifisch lysierbarer Zielzellen ist abhängig von der zur Infektion eingesetzten Virusdosis.

Legende zu Abbildung 12 Die Entstehung spezifisch lysierbarer Zielzellen ist abhängig von der zur Infektion eingesetzten Virusdosis.

In Expansionskulturen erzeugte MCMV-spezifische Effektor-CTL (Balb/c, 10^5 pfu MCMV intraplantar, popliteale Lymphknoten acht Tage p.i., 10^5 Lymphozyten pro Mikrokultur sechs Tage in vitro) dienten zum Nachweis derjenigen Antigene, welche im Zuge einer produktiven in vitro MCMV Infektion permissiver muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) exprimiert werden. Die syngenen MEF wurden entweder mit den angegebenen Mengen MCMV infiziert (2.5.4) und unter Bedingungen, die eine Synthese viraler Strukturproteine zulassen ("late" Bedingungen) für 20-24 Stunden inkubiert (o—o) oder aber zur Kontrolle mit den entsprechenden Mengen UV-inaktivierter Virionen scheininfiziert (●—●). Um die virale Replikation zu synchronisieren, wurde die Infektion unter der Wirkung einer Zentrifugation (800 g, 30 Minuten) durchgeführt, einer Bedingung, welche die effektive Infektiosität um den Faktor 20-80 erhöht und deshalb als "centrifugal enhancement of infectivity" bezeichnet wird. Die Dosis der Infektion wird in der Einheit pfu/Zelle angegeben und bezieht sich auf den im klassischen (nicht zentrifugalen) Virustitrationstest ermittelten Titer (2.5.3.1). In der Abbildung sind die Medianwerte der lytischen Aktivitäten von jeweils 24 individuellen Kulturen dargestellt. Die gestrichelte Linie bezeichnet die zur Optimumsbedingung (Pfeil) gehörende Nachweisgrenze.

die Optimumsbedingungen bis zu einem gewissen Grade variieren können, ist die UV-Kontrolle in jedem Experiment erforderlich.

3.2.2 Hinweise auf die Existenz eines durch Lymphozyten nachweisbaren Immediate Early Antigens

Nachdem die Voraussetzungen für den Nachweis neu synthetisierter Antigene geschaffen waren, konnten die Identität dieser Antigene und das temporale Muster ihrer Expression analysiert werden. Die Sequenz A-D in Abbildung 13 illustriert die Kinetik der Entstehung lysierbarer Zielzellen im Verlauf einer produktiven in vitro Infektion permissiver embryonaler Fibroblasten. Antigene waren durch Expansions-CTL frühestens 12 Stunden nach Infektion sicher nachweisbar (Spur C), also noch während der Early-Phase des viralen Replikationszyklus und damit bereits vor dem Beginn der viralen DNA Replikation. In der Late-Phase der Infektion konnte dann allerdings die höchste lytische Aktivität gemessen werden (Spur D). Dieser Befund ist ein Hinweis für eine Antigenität der in dieser Phase überwiegend synthetisierten viralen Strukturproteine. Wenn die virale Transkription durch Actinomycin D (Act.D) sofort nach Infektion (Spur A) oder auch erst 3 Stunden nach Infektion (Spur B) angehalten wurde, konnten noch keine Antigene durch CTL detektiert werden. Ein solches Ergebnis kann die Folge einer fehlenden oder zumindest quantitativ unzureichenden Antigenexpression auf diesen Zellen sein oder aber die Folge eines Fehlens von CTL mit Spezifität für tatsächlich exprimierte Antigene. Um zwischen diesen Alternativen zu entscheiden, wurde eine Besonderheit in der Regulation der Transkription bei Herpesviren genutzt:
In der initialen Phase der viralen Transkription werden nur die Immediate Early (I.E.) Gene abgelesen, also lediglich ein limitierter Teil des MCMV-Genoms (39). Die Synthese der I.E. Proteine ist bei normalem Verlauf der viralen Replikation zeitlich begrenzt und nur gering. Infektion in Gegenwart von Cycloheximid (CH) führt dagegen zu einer Akkumulation von

I.E. Transkripten und erlaubt nach Aufhebung des CH-Blocks in Gegenwart von Act.D eine selektive und dabei gleichzeitig erheblich verstärkte Synthese der I.E. Proteine (1.2.4).

Unter so definierten Bedingungen infizierte Zielzellen erwiesen sich als lysierbar (Spur F), und diese Lysierbarkeit war bedingt durch neu synthetisierte Antigene, da scheininfizierte Zellen bei gleicher Inhibitorbehandlung nicht lysierbar waren (Spur E). Demnach waren also offensichtlich CTL entsprechender Spezifität vorhanden. Dieser Befund schließt folglich die zweite Alternative aus und impliziert die Existenz eines durch Lymphozyten detektierbaren I.E. Antigens (lymphocyte-detected immediate early antigen, LYDIEA), dessen Nachweis allerdings eine Verstärkung der Expression voraussetzt (Vergleich der Spuren B und F).

Das in Abbildung 14 dargestellte Experiment bestätigte diese Aussagen unter etwas veränderten Bedingungen. Infolge einer erhöhten Infektionsdosis wurden extern integrierte Antigene nun detektiert. Scheininfektion der Zielzellen mit UV-inaktivierten Virionen (Spur B), Inhibition jeglicher Transkription durch sofortige Zugabe von Act.D (Spur C) oder Inhibition der Translation durch CH (Spur D) führten jeweils zu vergleichbarer Lysierbarkeit. Nach bereits erfolgter Antigenexpression hatte CH keine signifikant inhibierende Wirkung in der Lysephase (Vergleich der Spuren E und F). Die Expression von I.E. Antigenen (Vergleich der Spur A mit den Spuren B-D) erfordert also Infektion (A,B), Transkription (A,C) und Translation (A,D).

Parallel zu den zytolytischen Tests wurde in den verwendeten Zielzellen die Synthese der I.E. Proteine verfolgt, um die Unterschiede der Zielzellen auch auf molekularer Ebene zu demonstrieren (Abbildung 15). Im Gegensatz zu Infektionen mit Herpes Simplex Viren (36) wird die zelluläre Proteinsynthese im Verlauf einer Infektion mit MCMV nicht abgeschaltet (38). Der

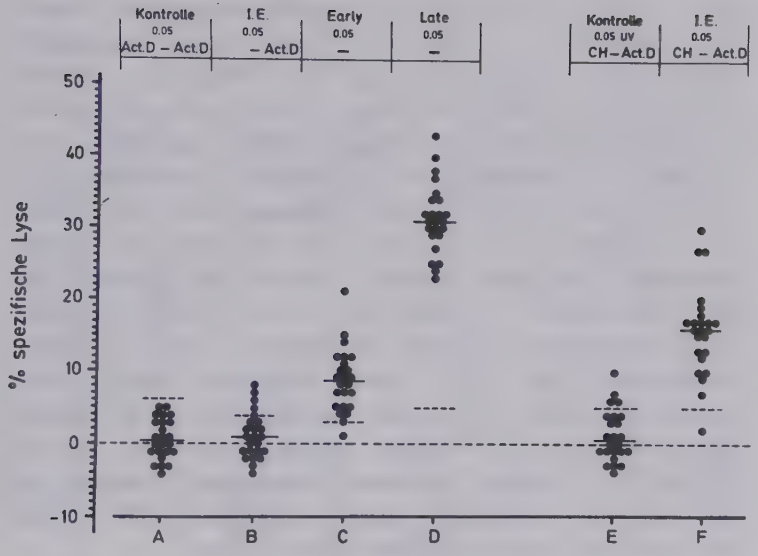


Abbildung 13 Kinetik der durch Infektion eingeleiteten Zielzellformierung und Verstärkung der Lyse durch den Einfluß von Cycloheximid auf die Transkriptionsrate der Immediate Early Gene

Legende zu Abbildung 13 Kinetik der durch Infektion eingeleiteten Zielzellformierung und Verstärkung der Lyse durch den Einfluß von Cycloheximid auf die Transkriptionsrate der Immediate Early Gene

MCMV-spezifische CTL wurden hergestellt wie in der Legende zu Abbildung 12 beschrieben und auf unterschiedlich konstruierten Zielzellen getestet. Die Dosis der Infektion betrug O.O5 pfu MCMV/MEF. Die rationale Begründung für die verschiedenen Inhibitorkombinationen wird in Abschnitt 3.2.2 gegeben. Die Behandlung mit metabolischen Inhibitoren ist in zwei Abschnitte geteilt. Der erste Abschnitt umfaßt den Vorgang der Infektion und die ersten drei Stunden der weiteren Inkubation. Der zweite Abschnitt erstreckt sich bis zum Ende der Testperiode. Cycloheximid (CH) wurde in einer Konzentration von O.O5 mg/ml, Actinomycin D (Act. D) in einer Konzentration von O.OO5 mg/ml eingesetzt. Unter "early" Bedingungen (Spur C) wurden einschließlich der Testperiode nicht mehr als 12 Stunden viraler Replikation in den prospektiven Zielzellen zugelassen, wohingegen Zielzellen, die Late Antigene exprimierten (Spur D), mindestens 2O Stunden vor Beginn des Lysetests infiziert worden waren.

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse

——— Medianwert der spezifischen Lyse

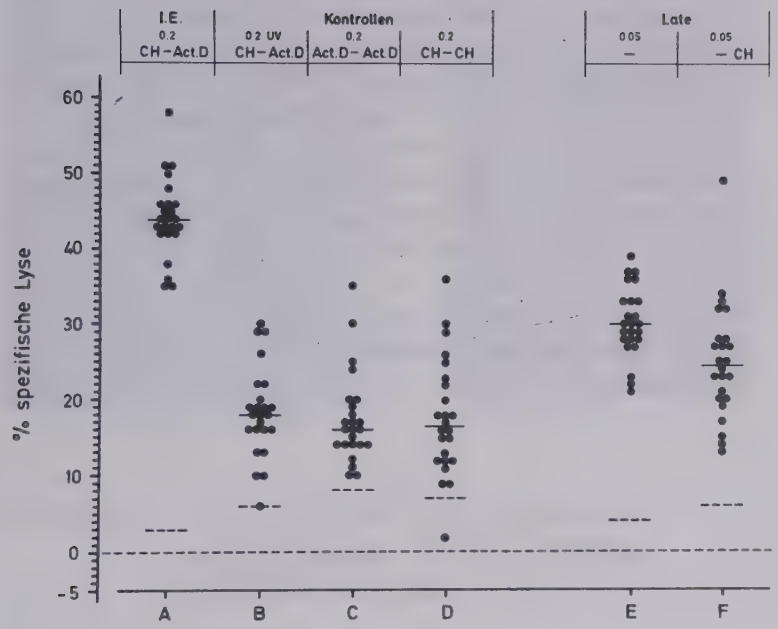


Abbildung 14 Die LYDIEA Expression erfordert Infektion, Transkription und Translation.

Legende zu Abbildung 14 Die LYDIEA Expression erfordert Infektion, Transkription und Translation.

Balb/c MEF wurden mit der Dosis 0.2 pfu MCMV/Zelle zentrifugal infiziert (A, C, D) oder scheininfiziert (B), und unterschiedliche Kombinationen der metabolischen Inhibitoren Cycloheximid (CH, 0.05 mg/ml) und Actinomycin D (Act. D, 0.005 mg/ml) wurden angewendet mit der Zielsetzung, die Expression von Immediate Early (I.E.) Antigenen entweder zu ermöglichen oder aber zu verhindern (A-D). Die Expression von Late Antigenen auf MEF wurde erreicht durch zentrifugale Infektion mit 0.05 pfu MCMV/Zelle und virale Replikation für die Dauer von 24 Stunden (E). Die Zielzellen der Gruppe F wurden darüberhinaus entsprechend der Behandlung der Zielzellen von Gruppe D in Gegenwart von CH weiterinkubiert, um den Einfluß von CH auf die Effektorphase der Lyse zu testen.

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse

——— Medianwert der spezifischen Lyse

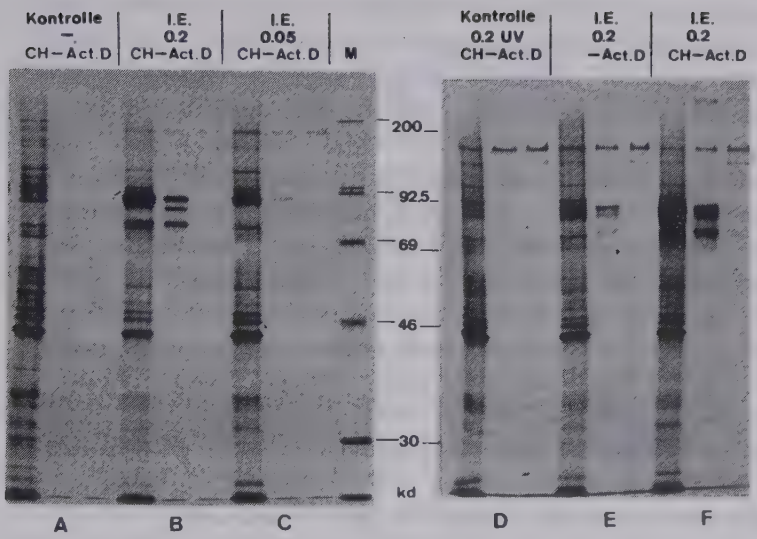


Abbildung 15 Rate der Immediate Early Proteinsynthese in MCMV infizierten MEF nach Aufhebung des Cycloheximid-Blocks

Legende zu Abbildung 15 Rate der Immediate Early Proteinsynthese in MCMV infizierten MEF nach Aufhebung des Cycloheximid-Blocks

Die Synthese von I.E. Proteinen in Zielzellen, die nach funktionellen Kriterien LYDIEA exprimierten, wurde mit der Technik der Immunpräzipitation analysiert (2.5.5). Die erste Spur in jeder triplikaten Gruppe zeigt die Polypeptide im Zellysat, welche unmittelbar nach der Entfernung des Inhibitors Cycloheximid (CH) synthetisiert wurden. Die zweite Spur zeigt jene Polypeptide, die mit Balb/c MCMV-spezifischem Immunserum präzipitiert werden konnten, und die dritte Spur dokumentiert als Spezifitätskontrolle das Fehlen einer Präzipitation mit autologem Präimmunserum. Vor der Inhibitorbehandlung waren die MEF mit der jeweils angegebenen Virusdosis zentrifugal infiziert oder zur Kontrolle nicht infiziert (A), beziehungsweise mit einer entsprechenden Dosis UV-inaktivierter Virionen scheininfiziert (D) worden.
M: Molekulargewichtsmarker (Kilodalton, kd)

(Die Immunpräzipitation wurde von Dr.G.M.Keil und Frau G.Röhrs durchgeführt.)

Nachweis viruskodierter oder virusinduzierter Proteine in infizierten Zellen wurde aus diesem Grunde durch Immunpräzipitation erbracht. Die Spuren A-C zeigen den Einfluß der Infektionsdosis auf die Rate der I.E. Proteinsynthese. Es wurden drei dominierende Polypeptide präzipitiert, wobei aufgrund von Studien mit monoklonalen Antikörpern antigene Gemeinsamkeiten zwischen der ersten und der dritten Bande angenommen werden müssen und somit die wahre Anzahl nativer I.E. Proteine noch nicht definitiv feststeht (G.M. Keil, Manuskript in Vorbereitung). Die Spuren D-F demonstrieren die durch CH indirekt vermittelte Verstärkung der Synthese von I.E. Proteinen. Nach Scheininfektion mit UV- inaktivierten Virionen konnten keine Polypeptide spezifisch präzipitiert werden, wodurch die Effektivität der Inaktivierung bewiesen wurde (Spur D).

Wie die Versuche gezeigt haben, ist parallel zur Verstärkung der Synthese der I.E. Proteine (Vergleich der Spuren E und F, Abb. 15) auch eine Verstärkung der CTL-Zielzell Interaktion nachweisbar (Vergleich der Spuren B und F, Abb. 13). Dieser Befund begründet die Arbeitshypothese der Identität zwischen dem verstärkt exprimierten Antigen LYDIEA und einem der verstärkt synthetisierten I.E. Proteine.

3.2.3 LYDIEA und membrangebundene virale Strukturantigene werden von separaten CTL Populationen erkannt.

Die bisher gezeigten Daten belegen die Existenz des von CTL detektierten und mit der I.E. Phase der viralen Replikation assoziierten Antigens LYDIEA auf Zellen, auf denen sich extern integrierte virale Strukturproteine durch CTL nicht nachweisen lassen. Da der Nachweis von LYDIEA eine Syntheseverstärkung voraussetzt, könnte es dennoch Bestandteil des Virions sein und als ein dominantes Antigen auch die Grundlage bilden für die

Tabelle 7 LYDIEA und membrangebundene virale Strukturantigene werden von separaten CTL Populationen erkannt.

Zielzellkombination	R_S	p	Hypothese der Korrelation
I.E.1 - I.E.2	.671	.006	akzeptiert
S1 - S2	.650	.009	akzeptiert
I.E.1 - S1	-.073	.363	verworfen
I.E.2 - S2	-.129	.268	verworfen
I.E.1 - S2	-.153	.233	verworfen
I.E.2 - S1	.072	.363	verworfen

Legende zu Tabelle 7 **LYDIEA und membrangebundene virale Strukturantigene werden von separaten CTL Populationen erkannt.**

Replikate Mikrokulturen (N = 24) wurden mit jeweils 10^5 aktivierten Lymphozyten (10^5 pfu MCMV intraplantar, popliteale Lymphknoten 8 Tage p.i.) angelegt. Nach sechs Tagen interleukin-vermittelter in vitro Expansion der IL-CTL-P wurde in jeder individuellen Mikrokultur die aus zytolytischen Effektorzellen bestehende oligoklonale Nachkommenschaft in vier gleiche Fraktionen geteilt. Zur Ermittlung von lytischer Aktivität und Spezifität wurden zwei der Aliquots (Gruppen I.E.1 und I.E.2) auf der Zielzelle I.E.-MEF (O.O5 pfu MCMV/Zelle, CH-Act.D) und die beiden anderen Aliquots (Gruppen S1 und S2) auf der mit viralen Strukturantigenen (4 pfu MCMV UV-inaktiviert/Zelle) beladenen Zielzelle S-MEF getestet.

Auf der Grundlage der lytischen Einzelaktivitäten wurde die Rangfolge der Kulturen ermittelt und der Spearman Rangkorrelationskoeffizient R_s berechnet (2.6.4.3). Die Hypothese der unabhängigen Verteilung (Nullhypothese) wurde verworfen und entsprechend die Alternativhypothese der Korrelation akzeptiert für positive Werte von R_s und $p < O.O5$ (einseitig).

Tabelle 8 Serotyp LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P[a)]

Behandlung		Zielzelle I.E.[b)]	Zielzelle UV-I.E.[c)]
		Medianwert (Range)% spezifische Lyse; Anteil negativer Kulturen	
Medium	+ C	10.0 (4.0-15.7); 2/24[d)]	1.0 (-2.3-6.1); 23/24
anti-Thy-1.2	+ C	-0.9 (-4.2-2.9); 24/24[d)]	— —
anti-Lyt-2.2	+ C	-0.6 (-3.4-2.3); 24/24	— —

a) Acht Tage nach intraplantarer Infektion (2.4.2) mit 10^5 pfu MCMV wurden die aktivierten Lymphozyten mit monoklonalem Antikörper und Complement behandelt (2.4.5.2). Pro Mikrokultur wurden dann 10^5 Zellen der depletierten Populationen unter Expansionsbedingungen zur Generierung von Effektor-CTL Klonen kultiviert.

b) 99% Toleranzlimit: 5.3% spezifische Lyse

c) 99% Toleranzlimit: 4.8% spezifische Lyse

d) Der Unterschied dieser beiden Gruppen ist signifikant mit $p = 1.0 \times 10^{-11}$ (Fisher-Yates Test, 2.6.4.1).

Lysierbarkeit von Zielzellen, die mit einer hohen Dosis UV-inaktivierter Virionen scheininfiziert wurden. Diese Möglichkeit wird durch das in Tabelle 7 wiedergegebene Korrelationsexperiment verneint. Demnach werden die entsprechenden Zielzellen von separaten CTL Populationen lysiert und teilen folglich keine für die Erkennung durch CTL relevanten Antigene. LYDIEA gehört also zumindest nicht zu den bei der Fusion in die Zellmembran integrierten Virionstrukturproteinen.

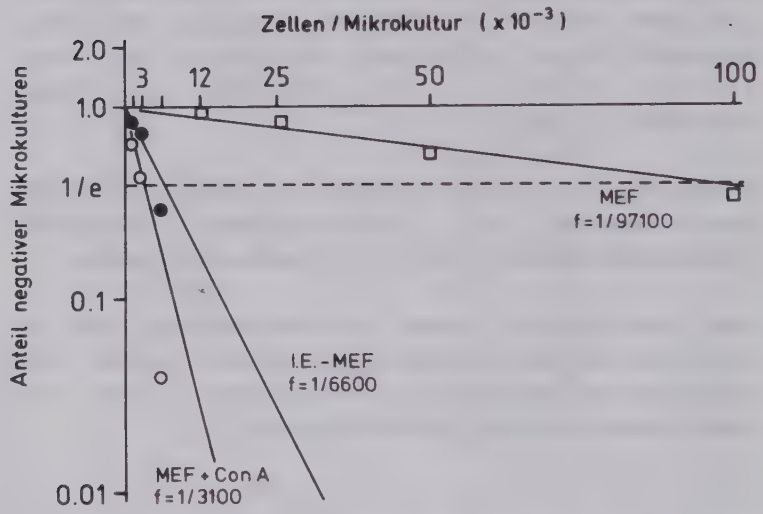
Wie durch die in Tabelle 8 gezeigte Phänotypanalyse ermittelt wurde, können auch LYDIEA-spezifische zytolytische Effektorzellen als Thy 1^+, Lyt 2^+ CTL charakterisiert werden.

Diese Beobachtungen erlauben die Schlußfolgerung, daß im Verlauf der Immunantwort gegen ein bestimmtes pathogenes Virus unterschiedliche Populationen von CTL aktiviert werden, die unterschiedliche Antigene spezifisch erkennen.

3.2.4 Ein substantieller Anteil der IL-CTL-P ist spezifisch für LYDIEA.

Wie in Abschnitt 3.1 dargelegt wurde, repräsentieren IL-CTL-P das in vivo aktivierte Repertoire an Spezifitäten frei von selektiven Einflüssen durch in vitro Restimulation. Die Frequenz von IL-CTL-P mit Spezifität für LYDIEA kann somit als ein quantitatives Kriterium zur Beurteilung der in vivo Bedeutung von LYDIEA dienen. Nach Abbildung 16 und Tabelle 9 stellen LYDIEA-spezifische IL-CTL-P einen zumindest substantiellen - wenn nicht sogar den dominierenden - Anteil der im Zuge der primären antiviralen Immunantwort sensibilisierten CTL-P. Da der Nachweis von LYDIEA auf den in vitro infizierten permissiven Zielzellen eine Verstärkung der Expression voraussetzt, ist die hohe Frequenz LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P überraschend und impliziert entweder eine hohe Immunogenität oder eine starke in

Abbildung 16 Ein substantieller Anteil der IL-CTL-P
Tabelle 9 ist spezifisch für LYDIEA.



Zielzelle	IL-CTL-P Frequenz (95% CL)/10^6	pMC
MEF (CH-Act.D)	1/97100; 10(7 - 14)	0.931
MEF+ConA (CH-Act.D)	1/ 3100; 320(212 - 428)	0.267
I.E-MEF (CH-Act.D)	1/ 6600; 151(92 - 210)	0.375
UV-I.E-MEF (CH-Act.D)	1/85300; 12(8 - 16)	0.346
Late-MEF (-Act.D)	1/12800; 78(58 - 99)	0.171

Legende zu Abbildung 16 Tabelle 9

Ein substantieller Anteil der IL-CTL-P ist spezifisch für LYDIEA.

Entsprechend 2.4.3.2 wurden insgesamt fünf replikate Limiting Dilution Experimente mit jeweils 24 Mikrokulturen pro Titrationsstufe unter Expansionsbedingungen angelegt. Die sensibilisierten Lymphozyten stammten aus der akuten Phase der Immunantwort in den drainierenden, ipsilateralen popitealen Lymphknoten, acht Tage nach intraplantarer Infektion mit 10^5 pfu MCMV. Die generierten Effektorzellen wurden dann gemäß 2.4.6 auf den in der Tabelle angegebenen Zielzellen ausgetestet. Als Spezifitätskontrolle dienten nichtinfizierte MEF, die jedoch auch sequentiell mit den metabolischen Inhibitoren Cycloheximid (CH) und Actinomycin D (Act.D) behandelt worden waren. Zur Erfassung des gesamten lytischen Potentials wurde diese Kontrollzielzelle, die konzeptionell keine MCMV-spezifizierten Antigene tragen kann, durch Concanavalin A (ConA) in der Effektorphase mit den CTL agglutiniert (2.4.6.2), wodurch die Antigenspezifitätsrestriktion der Lyse umgangen wurde. Die eigentlichen Testzielzellen wurden mit einer Virusdosis von O.O5 pfu/Zelle zentrifugal infiziert oder mit der entsprechenden Dosis UV-inaktivierter Virionen scheininfiziert (2.5.4). Der Zielzelle Late-MEF wurde zur Terminierung der Transkription nach 24 Stunden O.OO5 mg/ml Act.D zugesetzt. Die Schätzung der IL-CTL-P Frequenzen erfolgte nach dem Minimum Chi-Quadrat Verfahren (2.6.2.2).

vivo Expression von LYDIEA.

Transfer von aktivierten Lyt 2^+ Lymphozyten, die LYDIEA-spezifische IL-CTL-P enthielten, in subletal bestrahlte und danach akut MCMV-infizierte Mäuse führte zu einer erheblichen Reduktion der Virustiter in den Lungen der Rezipienten, in deren Serum auch nach dem Transfer keine MCMV-spezifischen Antikörper nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Es bleibt jedoch zu klären, ob tatsächlich die LYDIEA-spezifischen IL-CTL-P die Träger dieser in vivo protektiven Aktivität sind.

3.3 Analyse der zellulären Immunität in der latenten Phase der MCMV-Infektion

3.3.1 Etablierung von Latenz und Induktion von Rekurrenz

Die Versuchstiere wurden einen Tag nach der Geburt mit einer relativ geringen Dosis MCMV intraperitoneal infiziert (Abbildung 17). Zu diesem frühen Zeitpunkt ist das Immunsystem von Mäusen noch nicht ausgereift und so erlagen im Durchschnitt etwa 40% der neonatal infizierten Tiere den Folgen der Infektion, wobei die Todesfälle typischerweise in der dritten Woche eintraten. Die Überlebenden zeigten eine Wachstumsretardation bis zur vierten Woche und entwickelten sich dann aber phänotypisch normal. In den ersten drei Monaten persistierte eine produktive Infektion in den Speicheldrüsen. Nach vier bis sechs Monaten war in der Regel eine latente Infektion etabliert.

Die Problematik der Definition von Latenz wurde bereits im Abschnitt 1.3 dargelegt. Die latente Phase der Infektion ist demnach gekennzeichnet durch die Abwesenheit von infektiösem Virus bei gleichzeitiger Persistenz des viralen Genoms. Da der Ort der Latenz noch unbekannt ist, die Zahl der latent infizierten Zellen gering sein kann und zudem wenige Kopien eines Genoms nur schwer nachweisbar sind, ist die Induktion

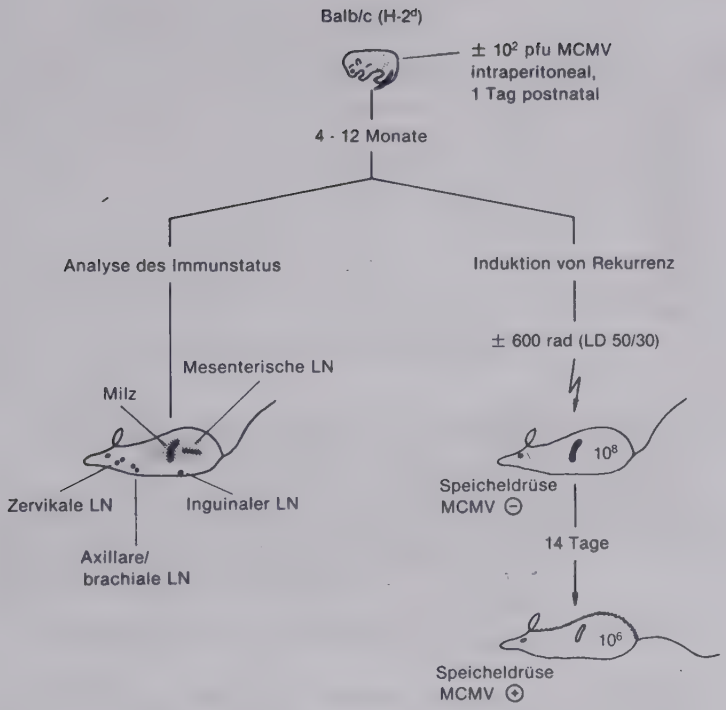


Abbildung 17 Experimentelles Schema zur Etablierung von Latenz und Induktion von Rekurrenz

Tabelle 10A Strahlungsinduzierte Rekurrenz von MCMV in latent infizierten Balb/c Mäusen[a)]

Experiment 1

Versuchstier Nr.	Virusnachweis in Organen[b)] Speicheldrüse[c)]	Milz
R1	+	-
R5	++	-
R6	++	+
R7	++	+
R10	+	-
R13	-	+
R16	+	-
R17	+	-
L17	-	+

a) Zur Etablierung einer latenten Infektion wurden neugeborene Balb/c Mäuse mit 100 pfu MCMV intraperitoneal infiziert (2.5.6.1). In einer Stichprobe randomisierter weiblicher Versuchstiere wurde nach acht Monaten der Latenzzustand überprüft.
Gruppe R: 20/40 Versuchstiere wurden mit 600rad (LD 50/30) bestrahlt (2.5.6.2). Im Verlauf von 14 Tagen erlagen 3/20 Tiere den Folgen der Bestrahlung.
Gruppe L: 20 latent infizierte, nicht bestrahlte Kontrolltiere

b) Der Nachweis von rekurrentem Virus wurde nach 14 Tagen entsprechend 2.5.3.4 geführt. Dabei wurden MEF Indikatorzellen mit 50% der Organhomogenate zentrifugal behandelt.
- : Keine MCMV-Plaques nachweisbar nach 4-5 Tagen; Titer <10 pfu/Organ
+ : MCMV-Plaques nachweisbar nach 4-5 Tagen; Titer >10 pfu/Organ
++ : MCMV-Plaques bereits nach 2-3 Tagen nachweisbar; Titer etwa 100 pfu/Organ

c) Gesamtheit der Speicheldrüsen, bestehend aus Parotis-, Sublingualis- und Submaxillarisdrüse

Tabelle 10B Strahlungsinduzierte Rekurrenz von MCMV in latent infizierten Balb/c Mäusen[a)]

Experiment 2

Versuchstier Nr.	Virusnachweis in Organen		
	Speicheldrüse	Milz	Lunge
R 1	-	-	+
R 6	++	-	-
R 8	-	-	+
R 9	++	+	++
R 10	+	-	-
R 2-5, 7	-	-	-
L 1-10	-	-	-

a) Durchführung analog Experiment 1, jedoch mit nur 10 Mäusen pro Gruppe

Tabelle 10C Strahlungsinduzierte Rekurrenz von MCMV in latent infizierten Balb/c Mäusen

Signifikanzanalyse durch Erstellen von Vierfelder-Verteilungen und deren Auswertung mit dem Fisher-Yates Test (2.6.4.1)

Experiment 1: Speicheldrüse

	R	L	Summe
+	7	0	7
-	10	20	30
Summe	17	20	37

$p = 1.89 \times 10^{-3}$ <0.05 signifikant

Experimente 1 und 2: Speicheldrüse

	R	L	Summe
+	10	0	10
-	17	30	47
Summe	27	30	57

$p = 1.95 \times 10^{-4}$ <0.05 signifikant

Experiment 2: Speicheldrüse und Lunge

	R	L	Summe
+	5	0	5
-	5	10	15
Summe	10	10	20

$p = 0.016$ <0.05 signifikant

von Virusrekurrenz durch Immunsuppression gegenwärtig noch die Methode der Wahl, um den Verdacht auf das Vorliegen von Latenz in einer Versuchstiergruppe zu begründen. Wie die Versuche der Tabellen 10A-C ausweisen, ist nach subletaler Bestrahlung in den Speicheldrüsen von 37% der neonatal infizierten Versuchstiere rekurrentes Virus nachweisbar. Der Indikatorort Speicheldrüse muß dabei aber keineswegs mit dem Latenzort identisch sein. Alle untersuchten Tiere erwiesen sich als seropositiv (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich konnten also anti-MCMV Antikörper qualitativ die Rekurrenz nicht verhindern. Es bleibt jedoch noch zu klären, inwieweit Antikörper für die relativ geringen Virustiter verantwortlich sind.

3.3.2 Nachweis LYDIEA-spezifischer Memory-CTL in der latenten Phase der MCMV-Infektion

Die Etablierung von immunologischem Gedächtnis begleitet die Etablierung von Viruslatenz, und Memory-CTL stellen ein reaktivierbares Potential zur Verhinderung von Virusrekurrenz in nicht immunsupprimierten, immunkompetenten Versuchstieren. Neu gegenüber den Arbeiten von Ho und Ashman (58) ist der Nachweis von Memory-CTL mit Spezifität für LYDIEA (Tabelle 11, Abbildung 18). Damit erhält die Hypothese einer sehr frühen Elimination rekurrent infizierter Zellen erstmals eine konkrete Grundlage.

Der Nachweis von Memory-CTL war nicht möglich ohne eine vorangegangene in vivo Immunisation (Gruppe K in Abb. 18) und erforderte eine Reaktivierung durch Antigen in vitro. IL-CTL-P waren in diesen Experimenten in dieser Phase der Infektion nicht nachweisbar (Tabelle 11). Wie Abbildung 18 verdeutlicht, war zu jedem Zeitpunkt während der Latenzphase die lytische Aktivität der in vitro reaktivierten CTL signifikant höher gegen I.E.-infizierte Zielzellen als gegen scheininfizierte UV-I.E. Zielzellen und damit LYDIEA-spezifisch. Diese Befunde schließen

Tabelle 11 Nachweis von Memory-CTL mit Spezifität für LYDIEA oder Late Antigen in latent infizierten Balb/c Mäusen[a)]

Zielzelle	Mesenterische Lymphknoten		Axillare/brachiale Lymphknoten	
	Expansion	Restimulation	Expansion	Restimulation
Late-MEF	<TL[b)]	37.5(17.3-67.0)[c)]	<TL	33.9(18.5-46.0)
I.E.-MEF(CH-Act.D)	<TL[b)]	29.4(5.1-45.2)	<TL	11.9(0.6-25.3)

a) Sechszehn Monate nach neonataler intraperitonealer Infektion mit 10^2 pfu MCMV (2.5.6.1) wurde durch Expansion von 10^5 Lymphozyten pro Mikrokultur das Vorhandensein von IL-CTL-P geprüft und durch Restimulation mit 0.2 pfu MCMV pro Zelle das Memory-Potential ermittelt. Die lytische Aktivität gegen die Zielzelle UV-I.E.-MEF lag in diesem Versuch unter der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

b) Nachweisgrenze, definiert durch das 99% Toleranzlimit der Spontanlyse (2.6.2.1): 3.9% spezifische Lyse für Late-MEF und 6.2% spezifische Lyse für I.E.-MEF

c) Medianwert (Range) der spezifischen Lyse (% P), ermittelt aus 24 Mikrokulturen (2.6.1.3)

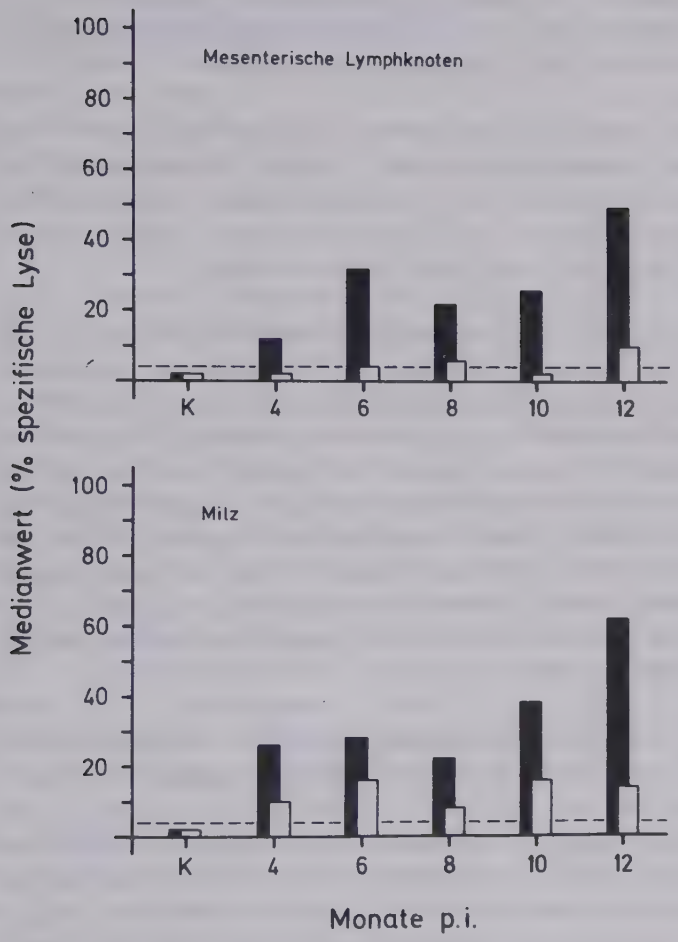


Abbildung 18 Nachweis LYDIEA-spezifischer Memory-CTL in viszeralen lymphatischen Organen individueller latent infizierter Balb/c Mäuse

Legende zu Abbildung 18 Nachweis LYDIEA-spezifischer Memory-CTL in viszeralen lymphatischen Organen individueller latent infizierter Balb/c Mäuse

Balb/c Mäuse wurden einen Tag nach der Geburt mit 10^2 pfu MCMV intraperitoneal infiziert (2.5.6.1). In den ersten drei Monaten persistierte eine produktive Infektion selektiv in den Speicheldrüsen und kam danach zum Erliegen. Nach 4-6 Monaten war in der Regel eine latente Infektion etabliert.

Zum Nachweis LYDIEA-spezifischer Memory-CTL in der Milz und in den superioren mesenterischen Lymphknoten individueller Mäuse wurden pro Mikrokultur 10^5 Lymphozyten in vitro mit 0.2 pfu MCMV/Zelle restimuliert. Die nach sechs Tagen entstandenen Effektor-CTL wurden gegen die infizierte Zielzelle I.E.-MEF (0.05 pfu MCMV zentrifugal, CH-Act.D; schwarze Balken) und zur Kontrolle gegen die scheininfizierte Zielzelle UV-I.E.-MEF (0.05 pfu UV-MCMV zentrifugal, CH-Act. D; weiße Balken) getestet. Dargestellt sind die Medianwerte der spezifischen Lyse von je sechs Einzelkulturen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Nachweisgrenze (2.6.2.1).

Das als Kontrolle (K) eingesetzte Tier war vier Monate alt und nicht infiziert. Der Infektionsstatus der übrigen Versuchstiere wurde durch zentrifugale Infektion von permissiven MEF Indikatorzellen mit Homogenaten der getesteten lymphatischen Organe sowie der Speicheldrüsen überprüft (2.5.3.4). Lediglich in der acht Monate alten Maus war MCMV noch oder wieder in den Speicheldrüsen nachweisbar, nicht aber in der Milz oder in den mesenterischen Lymphknoten.

eine Aktivierung LYDIEA-sensitiver NK-Zellen durch Interleukin in vitro aus und sichern nochmals die T-Zell Natur der LYDIEA-spezifischen CTL, denn der Aufbau von spezifischem Memory ist, neben der Selbstrestriktion der Lyse, der wesentlichste funktionelle Unterschied zwischen der NK-Zell-Immunantwort und der Immunantwort durch selbstrestringierte T-Lymphozyten.

3.3.3 Nachweis LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P in der latenten Phase der MCMV-Infektion

In einem bislang nicht reproduzierten, aber in sich gut kontrollierten Experiment, das somit den Stellenwert eines Befundes hat, konnten auch in der Latenzphase LYDIEA-spezifische IL-CTL-P nachgewiesen werden (Abbildung 19). Auf der Kontrollzielzelle UV-I.E. wurde eine Aktivität gemessen (Spur D), deren Träger Lyt 2.2^{-} Zellen waren (Spur E) und für die auch kein Memory etabliert war (Spur F). Diese Aktivität ist demzufolge als eine NK-Aktivität anzusprechen. Mit der LYDIEA-exprimierenden Zielzelle wurden dagegen Memory-CTL nachgewiesen (Spur C), und die LYDIEA-spezifischen IL-CTL-P exprimierten das Lyt 2.2 Differenzierungsantigen (Vergleich der Spuren A und B).

Dieser Befund ist somit ein Hinweis für eine mögliche in vivo Reaktivierung LYDIEA-spezifischer Memory-CTL zu sekundären IL-CTL-P im Verlauf einer spontanen Reaktivierung von in vivo MCMV-Antigenexpression.

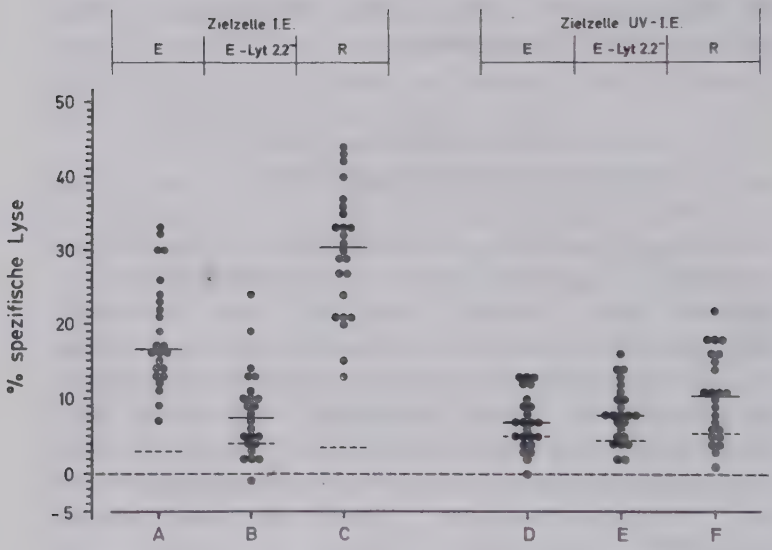


Abbildung 19 Nachweis LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P in mesenterischen Lymphknoten latent infizierter Balb/c Mäuse

Legende zu Abbildung 19 Nachweis LYDIEA-spezifischer IL-CTL-P in mesenterischen Lymphknoten latent infizierter Balb/c Mäuse

Acht Monate nach neonataler intraperitonealer Infektion mit 10^2 pfu MCMV wurden die Lymphozyten der mesenterischen Lymphknoten von insgesamt zehn Versuchstieren vereinigt und funktionell analysiert. Selbst mit der sehr sensitiven Methode der zentrifugalen Infektion (2.5.3.3) ließ sich in den Lymphozyten und in den Speicheldrüsen dieser Tiere kein infektiöses Virus nachweisen. Der Beweis für Viruslatenz wurde durch die in Tabelle 10 A-C gezeigten Experimente erbracht.

Die Lymphozyten wurden entweder nur mit Complement behandelt (A,C,D,F) oder durch Behandlung mit anti-Lyt-2.2 Antikörper plus C in zwei Zyklen für Lyt 2^+ Zellen depletiert (B,E) und dann bei einer Zelldichte von 10^5 Zellen/Mikrokultur für die Dauer von sechs Tagen in vitro entweder expandiert (A,B,D,E) oder mit 0.2 pfu MCMV/Zelle restimuliert (C,F). Die entstandenen zytolytischen Effektorzellen wurden gegen die Zielzellen I.E.-MEF (A-C) und UV-I.E.-MEF (D-F) getestet.

Der Unterschied zwischen den Gruppen A und B ist statistisch hoch signifikant mit einem Irrtumsrisiko für das Ablehnen der Nullhypothese von $p < 0.001$ (Exakter Rangsummentest nach Wilcoxon, 2.6.4.2).

----- 99% Toleranzlimit der Spontanlyse

——— Medianwert der spezifischen Lyse

4. DISKUSSION

Die Kenntnis der Identität der von spezifisch aktivierten CTL auf MCMV-infizierten Zellen erkennbaren Antigene ist die grundlegende Voraussetzung für eine Prognose der Bedeutung von CTL in verschiedenen Stadien der Pathogenese und insbesondere bei der latenten Infektion, während der infektiöse Virionen definitionsgemäß nicht gebildet werden und demzufolge auch keine Expression aller potentiellen Antigene erwartet werden kann.

Im Verlauf einer produktiven Infektion permissiver Zellen treten viele neue, viruskodierte oder zumindest virusinduzierte Proteine auf, von denen jedoch nur ein Teil als Strukturkomponenten des Virions identifiziert werden konnte (38), wohingegen andere nicht in das Virion eingebaut werden, sondern in der infizierten Zelle vermutlich eine regulatorische Funktion beim Ablauf des viralen Replikationszyklus wahrnehmen. Bei der Interaktion zwischen CTL und infizierten Zellen sind aber auch diese Proteine als Kandidaten für Antigene zu berücksichtigen.

Studien mit dem Parainfluenzavirus Sendai haben dagegen gezeigt, daß gereinigte Virushüllglykoproteine nach Insertion in die Zellmembran im Prinzip bereits hinreichend sind, um die Lysierbarkeit von Zellen durch CTL entsprechender Spezifität zu vermitteln (94). Die Infektion von Zellen mit, hinsichtlich ihrer Strukturproteine, serologisch verwandten oder distanten Viren diente daraufhin zur Ermittlung der Typspezifität von CTL. Allem Anschein nach erfassen CTL antigene Gemeinsamkeiten serologisch nicht verwandter Viren eines Genus, während neutralisierende Antikörper für antigene Unterschiede spezifisch sind (zusammenfassend diskutiert in 95).

Wie von Rosenthal et al. (96) gefunden wurde, können auch VSV- spezifische CTL-Klone mit den VSV-Serotypen VSV-IND und VSV-NJ infizierte Zellen kreuzreaktiv lysieren, und diese

Lyse konnte durch die entsprechenden serotypspezifischen, neutralisierenden Antikörper nicht inhibiert werden. Die Befunde wurden dahingehend interpretiert, daß die Antikörper und die Mehrheit der VSV- spezifischen CTL unterschiedliche Determinanten auf dem VSV Glykoprotein erkennen. Die Möglichkeit der Existenz separater anderer Antigene auf den infizierten Zellen wurde von den Autoren nicht in Betracht gezogen.

In Hinblick auf eine mögliche physiologische Rolle von CTL bei der Immunabwehr gegen ein bestimmtes, pathogenes und auch wirtsspezifisches Virus ist die Relevanz dieser Typspezifität von CTL nur begrenzt, zumal dann, wenn Viren miteinander verglichen werden, die natürlicherweise gar nicht denselben Wirt infizieren. Es erscheint somit vielversprechender zu untersuchen, ob CTL zwischen verschiedenen, von einem Virus spezifizierten und zu unterschiedlichen Zeiten des viralen Replikationszyklus exprimierten Antigenen unterscheiden können. Für den Nachweis einer solchen Replikationsstadien-Spezifität von CTL sind Infektionen mit Herpesviren besonders geeignet, da sie eine Unterteilung der viralen Genexpression in die distinkten Stadien Immediate Early, Early und Late zulassen, wobei die Synthese der viralen Strukturproteine der Late Phase zugeordnet werden kann, wohingegen den Immediate Early Proteinen als den ersten viralen Genprodukten nach Infektion vorrangig regulatorische Funktionen zukommen.

Anhand der Lyse von Zellen, die verstärkt und selektiv nur Immediate Early Proteine exprimierten, wurde in der vorliegenden Studie erstmals die Existenz eines Immediate Early Antigens demonstriert, das entsprechend der Erkennung durch MCMV-spezifische CTL als Lymphozyten-detektiertes Immediate Early Antigen (LYDIEA) bezeichnet wurde.
In Übereinstimmung mit der These von der Replikationsstadien-Spezifität der CTL konnten LYDIEA-spezifische CTL und CTL mit Spezifität für zellmembrangebundene virale Strukturproteine mit

Hilfe von Korrelationsstudien separaten CTL-Populationen zugeordnet werden.

Das Problem, ob frühe virusinduzierte Membranveränderungen von CTL erkannt werden können, ist bereits von anderen Autoren anhand der Infektionen mit den Pockenviren Vaccinia (97-99) und Ectromelia (100,101) sowie dem Rhabdovirus VSV (102) bearbeitet worden. Durch Verwendung von Virusmutanten (97,98) oder Inhibitoren der Proteinsynthese (100-102) konnte eine Lysierbarkeit infizierter Zellen vor der Replikation des viralen Genoms und vor dem Assembly der Virionen demonstriert werden. Übertragen auf das MCMV-System wären diese Attribute auch für Antigene aus der Early-Phase der viralen Replikation zutreffend und sind somit also keineswegs gleichzusetzen mit der Definition von Immediate Early Antigenen, die sich präzise der Aktivität eines kartierten, limitierten Teils des MCMV-Genoms zuordnen lassen (39). Eine Expression früher Antigene wurde auch bei Herpesvirusinfektionen schon vermutet (103-105), konnte jedoch experimentell nicht von der Integration viraler Strukturproteine während der Fusionsphase der Infektion unterschieden werden. Der Nachweis separater Populationen replikationsstadien-spezifischer CTL löst die bislang bestehenden interpretatorischen Widersprüche bezüglich der Voraussetzungen für die Lysierbarkeit infizierter Zellen.

Die Erkennung des Antigens LYDIEA durch CTL impliziert eine Membranexposition. Eine unabhängige Bestätigung dieses Postulats durch immunchemische Methoden steht noch aus. Wie gezeigt wurde, ist die Expression von LYDIEA eindeutig virusinduziert und abhängig sowohl von Transkription als auch von Translation. Es gibt jedoch bislang noch keinen Anhaltspunkt für eine Identität von LYDIEA mit einem der durch Immunpräzipitation nachgewiesenen Immediate Early Polypeptide und auch der formelle Beweis dafür, daß LYDIEA viruskodiert ist, muß erst noch erbracht werden. In mancherlei Hinsicht erinnert somit die Situation an ein anderes Herpesvirussystem,

nämlich an die Infektion des Menschen mit Epstein-Barr Virus (EBV), wo ein lymphozyten-detektiertes Membranantigen (LYDMA) von CTL auf transformierten B-Lymphozyten nachgewiesen wird und bisher auch noch nicht als virales Produkt identifiziert werden konnte (106, zusammenfassend diskutiert in 107,108). Übereinstimmend konnten weder LYDIEA-spezifische (Daten nicht gezeigt) noch LYDMA-spezifische Antikörper (108) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu LYDIEA korreliert allerdings die Expression von LYDMA nicht mit einer definierten Phase des viralen Replikationszyklus.

Der Nachweis von LYDIEA erforderte eine experimentelle Verstärkung der Expression der Immediate Early Proteine, deren Synthese während einer produktiven in vitro Infektion permissiver Zellen nur transient und quantitativ gering ist. Diese Tatsache könnte gegen eine in vivo Bedeutung von LYDIEA sprechen. Klone LYDIEA-spezifischer CTL entstehen durch Expansion aus in vivo sensibilisierten interleukinrezeptiven CTL-Vorläufern (IL-CTL-P) und sind keiner Selektion durch Antigen in vitro unterworfen. Die IL-CTL-P Frequenzen reflektieren somit das genuine Spezifitäten-Repertoire in vivo aktivierter CTL-Vorläufer. Wie demonstriert werden konnte, ist ein substantieller Anteil der IL-CTL-P spezifisch für LYDIEA, wodurch die Annahme begründet wird, daß LYDIEA in der Tat ein in vivo relevantes Immunogen darstellt, also entweder trotz quantitativ geringer Expression CTL-P entsprechender Spezifität sehr effizient aktiviert oder aber in vivo quantitativ wesentlich stärker exprimiert wird als die in vitro Systeme dies vermuten lassen.

Durch in vitro Reaktivierung mit Antigen konnte in lymphatischen Organen wie der Milz und den viszeralen sowie den somatischen Lymphknoten latent infizierter Versuchstiere die Existenz eines Potentials LYDIEA-spezifischer Memory-CTL nachgewiesen werden, und es gab erste Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer in vivo Reaktivierung dieser Memory-CTL zu

aktiven, sekundären IL-CTL-P. Da LYDIEA-spezifische CTL rekurrent infizierte Zellen vor der Dissemination von Viren eliminieren könnten, sind sie geeignete Kandidaten für eine Aufrechterhaltung des Latenzzustandes im Sinne der Immune Surveillance Theorie der Latenz. Damit sind die entscheidenden Voraussetzungen gegeben, um die eingangs formulierte Hypothese einer Immunkontrolle der Latenz zu rechtfertigen.

Der Beweis für protektive Aktivität LYDIEA-spezifischer CTL in vivo erfordert den Transfer klonierter LYDIEA-spezifischer CTL in durch Immunsuppression rekurrent infizierte Versuchstiere. Die Herstellung solcher Klone für in vivo Studien sowie die Aufklärung der molekularen Identität des neu definierten Antigens LYDIEA sind die nächsten Ziele der Forschung auf diesem Gebiet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Immediate Early Proteine sind die Produkte der ersten Aktivität des viralen Genoms nach Infektion permissiver Zellen mit dem Murinen Zytomegalovirus und haben nach bisherigen Vorstellungen regulatorische Funktionen in der initialen Phase des viralen Replikationszyklus. Die viralen Strukturproteine werden dagegen vorrangig erst in der Late Phase des viralen Replikationszyklus synthetisiert.

Es konnte nun erstmals korrelierend mit der Synthese der viruskodierten Immediate Early Proteine die Expression eines virusinduzierten und syntheseabhängigen Antigens nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte mit zytolytischen T-Lymphozyten (CTL) anhand der Lyse von Zellen, welche unter Bedingungen, die selektiv nur die Synthese der Immediate Early Proteine zulassen, infiziert worden waren und darauf bezugnehmend erfolgte die Benennung dieses Antigens als ein Lymphozyten-detektiertes Immediate Early Antigen (LYDIEA).

Da LYDIEA-spezifische CTL die infizierten Zellen in einem sehr frühen Stadium der viralen Replikation erkennen und CTL mit Spezifität für zellmembrangebundene virale Strukturproteine einer separaten Population angehören, die sich einem späten Stadium der viralen Replikation zuordnen läßt, wurde die Idee einer Replikationsstadien-Spezifität von CTL diskutiert.

Bei einer in vitro produktiven Infektion permissiver Zellen wird die Synthese der Immediate Early Proteine reguliert und ist infolgedessen nur transient und quantitativ gering. Dennoch erwies sich ein substantieller Anteil der im Verlauf einer akuten MCMV-Infektion in vivo sensibilisierten, interleukinrezeptiven CTL-Vorläufer (IL-CTL-P) als LYDIEA-spezifisch, wodurch die Vermutung begründet wird, daß LYDIEA ein in vivo relevantes Immunogen darstellt. In latent infizierten Versuchstieren konnte die Existenz eines Potentials LYDIEA-spezifischer Memory-CTL bewiesen werden, und es gab erste Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer in vivo Reaktivierung dieser Memory-CTL zu sekundären IL-CTL-P.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Roizman, B. 1982. The family herpesviridae: General description, taxonomy, and classification. In: The Herpesviruses. B. Roizman, Ed. Plenum Press, New York. Vol. 1:1-17.
2. Weller, T.H. 1971. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. New Engl.J.Med. 285:203-214, 267-274.
3. Hanshaw, J.B. 1971. Congenital cytomegalovirus infection: a fifteen year perspective. J.Infect.Dis. 123:555-561.
4. Osborn, J.E. 1981. Cytomegalovirus: pathogenicity, immunology, and vaccine initiatives. J.Infect.Dis. 143:618-630.
5. Hamilton, J.D. 1982. Cytomegaloviruses and immunity. Monographs in Virology. J.L. Melnick, Ed. S. Karger, Basel: 27-29.
6. Thomas, E.D., R. Storb, R.A. Clift, A. Fefer, F.L. Johnson, P.E. Neiman, K.G. Lerner, H. Glucksberg and C.D. Buckner, 1975. Bone-marrow transplantation. New Engl.J.Med. 292:832-843, 895-902.
7. Neuman, P., P.B. Wasserman, B.B. Wentworth, G.F. Kao, K.G. Lerner, R. Storb, C.D. Buckner, R. A. Clift, A. Fefer, L. Fass, H. Glucksberg und E.D. Thomas. 1973. Interstitial pneumonia and cytomegalovirus infection as complications of human marrow transplantation. Transplantation. 15:478-485.
8. Neiman, P.E., W. Reeves, G. Ray, N. Flournoy, K.G. Lerner, G.E. Sale und E.D. Thomas. 1977. A prospective analysis of interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. J.Infect.Dis. 136:754-767.
9. Meyers, J.D., N. Flournoy and E.D. Thomas. 1982. Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: A review of ten years' experience. Rev.Infect.Dis. 4:1119-1132.

10. Appelbaum, F.R., J.D. Meyers, A. Fefer, N. Flournoy, M.A. Cheever, P.D. Greenberg, R. Hackman und E.D. Thomas. 1982. Nonbacterial nonfungal pneumonia following marrow transplantation in 100 identical twins. Transplantation 33:265-268.

11. Hamilton, J.D. 1982. Cytomegaloviruses and immunity. Monographs in Virology. J.L. Melnick, Ed. S. Karger, Basel:61-68.

12. Rubin, R.H., P.S. Russell, M. Levin und C. Cohen. 1979. From the National Institutes of Health. Summary of a workshop on cytomegalovirus infections during organ transplantation. J.Infect.Dis. 139:728-734.

13. Craighead, J.E., J.B. Hanshaw and C.B. Carpenter. 1967. Cytomegalovirus infection after renal allotransplantation. JAMA. 201:99-102.

14. Pass, R.F., W.K. Long, R.J. Whitley, S.-J. Soong, A.G. Diethelm, D.W. Reynolds und C.A. Alford, Jr. 1978. Productive infection with cytomegalovirus and herpes simplex virus in renal transplant recipients: role of source of kidney. J.Infect.Dis. 137:556-563.

15. Hamilton, J.D. 1982. Cytomegaloviruses and immunity. Monographs in Virology. J.L. Melnick, Ed.S.Karger, Basel:31-46.

16. Winston, D.J., R.B. Pollard, W.G. Ho, J.G. Gallagher, L.E. Rasmussen, S.N.-Y. Huang, C.-H. Lin, T.G. Gossett, T.C. Merigan und R.P. Gale. 1982. Cytomegalovirus immune plasma in bone marrow transplant recipients. Ann.Intern.Med. 97:11-18.

17. Hamilton, J.D. 1982. Cytomegaloviruses and immunity. Monographs in Virology. J.L. Melnick, Ed.S.Karger, Basel:1-26, 47-60.

18. Jordan, M.C. 1978. Murine models of cytomegalovirus latency. In: Persistent viruses. J.G. Stevens, G.J. Todaro and C.F. Fox, Ed. Academic Press, New York:805-810.

19. Hudson, J.B. 1979. The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent

infections. Arch.Virol. 62:1-29.

20. Brody, A.R. and J.E. Craighead. 1974. Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. J.Infect.Dis. 129:677-689.

21. Gardner, M.B., J.E. Officer, J. Parker, J.D. Estes und R.W. Rongey. 1974. Induction of disseminated virulent cytomegalovirus infection by immunosuppression of naturally, chronically, infected wild mice. Infect.Immunity 10:966-969.

22. Mayo, D.R., J.A. Armstrong, M. Ho 1977. Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. Nature 267:721-723.

23. Jordan, M.C., J.D. Shanley, J.G. Stevens. 1977. Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. J.gen.Virol. 37:419-423.

24. Shanley, J.D., M.C. Jordan, M.L. Cook und J.G. Stevens. 1979. Pathogenesis of reactivated latent murine cytomegalovirus infection. Am.J.Pathol. 95:67-80.

25. Jordan, M.C. 1978. Interstitial pneumonia and subclinical infection after intranasal inoculation of murine cytomegalovirus. Infect.Immunity 21:275-280.

26. Shanley, J.D., E.L. Pesanti und K.M. Nugent. 1982. The pathogenesis of pneumonitis due to murine cytomegalovirus. J.Infect.Dis. 146:388-396.

27. Weller, T.H. 1970. Cytomegaloviruses: the difficult years. J.Infect.Dis. 122:532-539.

28. Smith, M.G. 1954. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 86:435-440.

29. Ebeling, A., G.M. Keil, E. Knust und U.H. Koszinowski. 1983. Molecular cloning and physical mapping of murine cytomegalovirus DNA. J.Virol. 47:421-433.

30. Mercer, J.A., J.R. Marks and D.H. Spector. 1983. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of the murine cytomegalovirus genome (Smith st.ain). Virology 129:94-106.

31. Kim, K.S., V.J. Sapienza, R.I. Carp und H.M. Moon. 1976. Analysis of structural proteins of purified murine cytomegalovirus. J.Virol. 17:906-915.

32. Hudson, J.B., V. Misra und T.R. Mosmann. 1976. Properties of the multicapsid virions of murine cytomegalovirus. Virology 72:224-234.

33. Chong, K.T. und C.A. Mims. 1981. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. J.gen.Virol. 57:415-419.

34. Jordan, M.C. und J.L. Takagi. 1983. Virulence characteristics of murine cytomegalovirus in cell and organ cultures. Infect.Immunity 41:841-843.

35. Honess, R.W. und B. Roizman. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. J.Virol. 14:8-19.

36. Spear, P.G. und B.Roizman. 1980. Herpes Simplex Viruses. In: DNA tumor viruses. T.Tooze, Ed. Cold Spring Harbor monographs 10B:658-667.

37. Honess, R.W. und B. Roizman. 1975. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72:1276-1280.

38. Chantler, J.K. und J.B. Hudson. 1978. Proteins of murine cytomegalovirus: identification of structural and nonstructural antigens in infected cells. Virology 86:22-36.

39. Keil, G.M., A. Ebeling-Keil und U.H. Koszinowski. 1984. Temporal regulation of murine cytomegalovirus transcription and mapping of viral RNA synthesized at immediate early times after infection. J.Virol. (zur Veröffentlichung eingereicht).

40. Openshaw, H. 1984. A review of HSV latency in experimental animals. In: Latent herpesvirus infections in veterinary medicine. G. Wittmann, R.M. Gaskell und H.-J. Rziha, Eds. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Martin Nijhoff Publ. (im Druck).

41. Roizman, B. 1965. An inquiry into the mechanisms of recurrent herpes infections in man. In: Perspectives in Virology. M. Pollard, Ed., Harper and Row, New York:283-301.

42. Wise, T.G., J.E. Manischewitz, G.V. Quinnan, G.S. Aulakh, F.A. Ennis. 1979. Latent cytomegalovirus infection of Balb/c mouse spleens detected by an explant culture technique. J.gen.Virol. 44:551-556.

43. Jordan, M.C., J.L. Takagi und J.G. Stevens. 1982. Activation of latent murine cytomegalovirus in vivo and in vitro: a pathogenetic role for acute infection. J.Infect.Dis. 145:699-705.

44. Dutko, F.J. und M.B.A. Oldstone, 1981. Cytomegalovirus causes a latent infection in undifferentiated cells and is activated by induction of cell differentiation. J.Exp.Med. 154:1636-1651.

45. Olding, L.B., F.C. Jensen und M.B.A. Oldstone. 1975. Pathogenesis of cytomegalovirus infection. I. Activation of virus from bone marrow - derived lymphocytes by in vitro allogenic reaction. J.Exp.Med. 141:561-572.

46. Brautigam, A.R., F.J. Dutko, L.B. Olding und M.B.A. Oldstone. 1979. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: the macrophage as a permissive cell for cytomegalovirus infection, replication and latency. J.gen.Virol. 44:349-359.

47. Shellam, G.R., J.E. Allan, J.M. Papadimitriou und G.J. Bancroft. 1981. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 78:5104-5108.

48. Grundy (Chalmer), J.E. und C.J.M. Melief. 1982. Effect of Nu/Nu gene on genetically determined resistance to murine cytomegalovirus. J.gen.Virol. 61:133-136.

49. Quinnan, G.V. und J.E. Manischewitz. 1979. The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. J.Exp.Med. 150:1549-1554.

5O. Quinnan, G.V., J.E. Manischewitz und F.A. Ennis. 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. Nature 273:541-543.

51. Quinnan, G.V., J.E. Manischewitz und F.A. Ennis. 198O. Role of cytotoxic T lymphocytes in murine cytomegalovirus infection. J.gen.Virol. 47:5O3-5O8.

52. Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248:7O1-7O2.

53. Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty. 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature 251:547-548.

54. Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty. 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. Adv.Immunol. 27:51-177.

55. Klein, J. 1979. The major histocompatibility complex of the mouse. Science 2O3:516-521.

56. Burnet, F.M. 1971. Immunological surveillance in neoplasia. Transplant. Rev. 7:3-25.

57. Ho, M. 198O. Role of specific cytotoxic lymphocytes in cellular immunity against murine cytomegalovirus. Infect.Immunity 27:767-776.

58. Ho, M. und R.B. Ashman. 1979. Development in vitro of cytotoxic lymphocytes against murine cytomegalovirus. Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 57:425-428.

59. Osborn, J.E. und D.L. Walker. 197O. Virulence and attenuation of murine cytomegalovirus. Infect. Immunity 3:228-236.

6O. Kramer, M. und U. Koszinowski. 1982. T cell-specific suppressor factor(s) with regulatory influence on interleukin 2 production and function. J.Immunol. 128:784-79O.

61. Reddehase, M.J., W. Suessmuth, C. Moyers, W. Falk und W. Dröge. 1982. Interleukin 2 is not sufficient as helper component for the activation of cytotoxic T lymphocytes but synergizes with a late helper effect that is provided by irradiated I-region-incompatible stimulator cells. J.Immunol. 128:61- 68.

62. Salisbury, J.G., J.M. Graham und C.A. Pasternak. 1979. A rapid method for the separation of large and small thymocytes from rats and mice. J.Biochem. Biophys.Methods 1:341-347.

63. Mark, C., F. Figueroa, Z.A. Nagy and J. Klein. 1982. Cytotoxic monoclonal antibody specific for the Lyt-1.2 antigen. Immunogenetics 16:95- 97.

64. Marshak-Rothstein, A., P. Fink, T. Gridley, D.H. Raulet, M.J. Bevan und M.L. Gefter. 1979. Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus. J.Immunol. 122:2491-2497.

65. Brunner, K.T., J. Mauel, J.-C. Cerottini und B. Chapuis. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. Immunology 14:181-196.

66. Cerottini, J.-C. und K.T. Brunner. 1974. Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection, and tumor immunity. Adv.Immunol. 18:67-132.

67. Miller, R.G. und M. Dunkley. 1974. Quantitative analysis of the 51-Cr release cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes. Cell.Immunol. 14:284-302.

68. Teh, H.-S., E. Harley, R.A. Phillips und R.G. Miller. 1977. Quantitative studies on the precursors of cytotoxic lymphocytes. I. Characterization of a clonal assay and determination of the size of clones derived from single precursors. J.Immunol. 118:1049-1056.

69. Muller, M., V. Misra, J.K. Chantler und J.B. Hudson. 1978. Murine cytomegalovirus gene expression during nonproductive infection in Go-phase 3T3 cells. Virology

9O:279-287.

7O. Hudson. J.B., V. Misra und T.R. Mosmann. 1976. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. Virology 72:235-243.

71. Miller, R.G., H.-S. Teh, E. Harley und R.A. Phillips. 1977. Quantitative studies of the activation of cytotoxic lymphocyte precursor cells. Immunological Rev. 35:38-58.

72. Miller, R.G. 1982. Analysis of T cells by limiting dilution, an overview. In: Isolation, characterization and utilization of T lymphocyte clones. C.G. Fathman und F.W. Fitch, Eds. Academic Press, New York: 219-231.

73. Lefkóvits, I. und H.Waldman. 1979. Limiting dilution analysis of cells in the immune system. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

74. Fazekas de St.Groth, S. 1982. The evaluation of limiting dilution assays. J.Immunol.Meth. 49:R11-R23.

75. Taswell, C. 1981. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. J.Immunol. 126:1614-1619.

76. Finney, D.J. 1952. Statistical methods in biological assay. Griffin, London: 45O.

77. Armitage, P. 1971. Statistical methods in medical research. Blackwell Scientific Publications: 391-393.

78. Lienert, G.A. 1973. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik, Hain, Band I:171-174.

79. Lienert, G.A. 1973. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Hain, Band I:23O-233.

8O. Lienert, G.A. 1975. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Hain, Tafelband: 76-8O.

81. Lienert, G.A. 1973. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Hain, Band I:59O-593, 596.

82. Beyer, W.H., Ed. 1968. Handbook of tables for probability and statistics. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio: 125-134.

83. Coutinho, A., E.-L. Larsson, K.-O. Grönvic und J. Andersson. 1979. Studies on T lymphocyte activation II.

The target cells for concanavalin A-induced growth factors. Eur.J.Immunol. 9:587-592.

84. Gillis, S., K.A. Smith. 1977. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. Nature 268:154-156.

85. Raulet, D.H. und M.J. Bevan. 1982. A differentiation factor required for the expression of cytotoxic T-cell function. Nature 296:754-757.

86. Falk, W., D.N. Männel und W. Dröge. 1983. Activation of cytotoxic T lymphocytes requires at least two spleen cell-derived helper factors besides interleukin 2. J.Immunol. 13O:2214-2218.

87. Kanagawa, O., J. Louis und J.-C. Cerottini. 1982. Frequency and cross- reactivity of cytolytic T lymphocyte precursors reacting against male alloantigens. J.Immunol. 128:2362-2366.

88. Teh, H.-S., J. Bennink und H. von Boehmer. 1982. Selection of the T cell repertoire during ontogeny: limiting dilution analysis. Eur.J.Immunol. 12:887-892.

89. Rouse, B.T., H.S. Larsen und H.Wagner. 1983. Frequency of cytotoxic T lymphocyte precursors to herpes simplex type 1 as determined by limiting dilution analysis. Infect. Immunity 39:785-792.

9O. Reddehase, M.J., J.H. Cox und U.H. Koszinowski. 1982. Frequency analysis of cytolytic T cell precursors (CTL-P) generated in vivo during lethal rabies infection of mice I. Distinction of CTL-P with different interleukin 2 sensitivity. Eur.J.Immunol. 12:519-523.

91. Ballas, Z.K. und G.B. Ahmann. 1983. Generation of cytotoxic T lymphocytes against modified self in the absence of antigen by interleukin 2-containing preparations. Cell.Immunol. 76:81-93.

92. Dennert, G., G. Yogeeswaran und S. Yamagata. 1981. Cloned cell lines with natural killer activity. J.Exp.Med. 153:545-556.

93. Cantor, H. und E.A. Boyse. 1976. Regulation of cellular und humoral immune responses by T-cell subclasses.

4. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 41:23-32.

94. Koszinowski, U., M.J. Gething und M. Waterfield. 1977. T cell cytotoxicity in the absence of viral protein synthesis in target cells. Nature 267:160-163.

95. Zinkernagel, R.M. und K.L. Rosenthal. 1981. Experiments and speculation on antiviral specificity of T and B cells. Immunological Rev. 58:131-155.

96. Rosenthal, K.L., M.B.A. Oldstone, H. Hengartner und R.M. Zinkernagel. 1983. Specificity of in vitro cytotoxic T cell clones directed against vesicular stomatitis virus. J.Immunol. 131:475-478.

97. Ueda, Ý. und I. Tagaya. 1973. Induction of skin resistance to vaccinia virus in rabbits by vaccinia-soluble early antigens. J.Exp.Med. 138:1033-1043.

98. Koszinowski, U. und H. Ertl. 1976. Role of early viral surface antigens in cellular immune response to vaccinia virus. Eur.J.Immunol. 6:679-683.

99. Zinkernagel, R.M. und A. Althage. 1977. Antiviral protection by virus- immune cytotoxic T cells: infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled. J.Exp.Med. 145:644-651.

100. Ada, G.L., D.C. Jackson, R.V. Blanden, R. Tha Hla und N.A. Bowern. 1976. Changes in the surface of virus-infected cells recognized by cytotoxic T cells. I. Minimal requirements for lysis of ectromelia-infected P815 cells. Scand.J.Immunol. 5:23-30.

101. Jackson, D.C., G.L. Ada und R. Tha Hla. 1976. Cytotoxic T cells recognize very early, minor changes in ectromelia virus- infected target cells. Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 54:349-363.

102. Zinkernagel, R.M., B. Adler und J.J. Holland. 1978. Cell-mediated immunity to vesicular stomatitis virus infections in mice. Expl.Cell.Biol. 46:53-70.

103. Pfizenmaier, K., H. Jung, A. Starzinski-Powitz, M. Röllinghoff und H. Wagner. 1977. The role of T cells in anti-herpes simplex virus immunity. I. Induction of

antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. J.Immunol. 119:939-944.

104. Sethi, K.K. und H. Brandis. 1979. Induction of virus specific and H-2 restricted cytotoxic T cells by UV inactivated murine cytomegalovirus. Arch.Virol. 60:227-238.

105. Sethi, K.K. und M.H. Wolf. 1980. The nature of host-cell herpes-simplex virus interaction(s) that renders cells susceptible to virus-specific cytotoxic T cells. Immunobiol. 157:365-378.

106. Svedmyr, E. und M. Jondal. 1975. Cytotoxic effector cells specific for B cell lines transformed by Epstein-Barr virus are present in patients with infectious mononucleosis. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72:1622-1626.

107. Robinson, J.E. und G. Miller 1982. Biology of lymphoid cells transformed by Epstein-Barr virus. In: The Herpesviruses. B. Roizman, Ed. Plenum Press, New York. Vol. 1:164-167.

108. Henle, W. und G. Henle. 1982. Immunology of Epstein-Barr virus. In: The Herpesviruses. B. Roizman, Ed. Plenum Press, New York. Vol. 1: 215-216.

Lebenslauf

Matthias Johannes Reddehase
geboren am 17. August 1954
in Mittenwald

Schulbesuch:

1961 - 1965	Evgl. Volksschule, Mittenwald
1965 - 1968	Math.-nat. Gymnasium mit Schülerheim, Hohenschwangau
1969 - 1974	Adolf - Schmitthennergymnasium, Neckarbischofsheim
28. Mai 1974	Erlangung der Hochschulreife

Hochschulausbildung:

Oktober 1974 - Juni 1979	Studium der Fachrichtung Biologie, Chemie und Physik für das Lehramt an Gymnasien an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
Juni 1979 - Mai 1980	Anfertigung einer Staatsexamensarbeit im Fach Biologie am Institut für Immunologie und Genetik des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg
18. Juni 1980	Zeugnis über die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien
August 1980 - August 1983	Erstellung der vorliegenden Dissertation am Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, unter Anleitung von Priv.Doz.Dr.U.H.Koszinowski
Seit September 1983	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

W.Dröge, K.Eichmann, H.Faulstich, U.Gehring, E.Hecker, Frau H.Jantzen, H.Jockusch, J.Knappe, F.Marks, F.Melchers, G.Sauer, P.v.Sengbusch, Frau M.Schachner, V.Schirrmacher, E.Schnepf, K.-H.Willer.